

Letícia Batelli de Oliveira

**ENTERITE VIRAL EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE
INFECTADOS**

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2020**

Letícia Batelli de Oliveira

**ENTERITE VIRAL EM FRANGOS DE CORTE NATURALMENTE
INFECTADOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da
Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como
requisito para obtenção do grau de Doutora em Ciência Animal

Área de concentração: Patologia Animal

Orientadora: Prof^a. Dra. Roselene Ecco

Co-orientadores: Prof. Dr. Nelson Rodrigo da Silva Martins e Prof.
Dr. Leonardo José Camargos Lara

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária - UFMG
2020**

Oliveira, Letícia Batelli de -1989.
O48e Enterite viral em frangos de corte naturalmente infectados/Letícia Batelli de Oliveira– 2020.

76f: il.

Orientadora: Roselene Ecco
Coorientadores: Nelson Rodrigo da Silva Martins
Leonardo José Camargos Lara

Tese (Doutorado) apresentado a Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Área de concentração: Patologia Animal.

1- Frango - Teses - 2- Doença - Teses – 3- Vírus - Teses - I- Ecco, Roselene -
II – Martins, Nelson Rodrigo da Silva – III- Lara, Leonardo José Camargos -
IV – Universidade Federal De Minas Gerais, Escola de Veterinária – V – Título.

CDD – 636.513

Bibliotecária responsável Cristiane Patrícia Gomes – CRB2569

Folha de aprovação

UFMG UNIVERSIDADE FEDERAL
DE MINAS GERAIS

FOLHA DE APROVAÇÃO

LETÍCIA BATELLI DE OLIVEIRA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Patologia Animal.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Rosilene Ecco

Dr.(a). Rosilene Ecco
Presidente - Orientador(a)

Oliveiro Caetano Neto

Dr.(a). Oliveiro Caetano de Freitas Neto

Mauricio Resende

Dr.(a). Mauricio Resende

Renata Assis Casagrande

Dr.(a). Renata Assis Casagrande

Juliana Fortes Vilarinho Braga

Dr.(a). Juliana Fortes Vilarinho Braga



Agradecimentos/Acknowledgements

Primeiramente, a Deus pelo dom da vida.

Ao meu pai (*in memorian*) pelo amor incondicional, educação, conselhos e ensinamentos que foram a base para a conclusão desta etapa e que servirá de apoio para as próximas. E por mostrar que nossa maior limitação somos nós mesmos.

À minha mãe pelo amor incondicional, pela paciência, apoio e carinho nos momentos mais difíceis da minha vida. E por mostrar que nossos anseios podem ser alcançados com esforço, dedicação e estudo!

Aos meus irmãos, Pedro Batelli de Oliveira e Francisco Souza de Oliveira Neto, eternos amigos e companheiros, com os quais sempre poderei contar e confiar.

Aos meus avôs que sempre me incentivaram e são um exemplo de vida.

Ao meu namorado, Guilherme Reis Blume, que sempre está do meu lado desfrutando da vida com muito amor e carinho, seja em momentos fáceis ou difíceis, me incentiva e junto comigo faz essa caminhada profissional desgastante, porém gratificante. Afinal, ver a progressão de um aluno é uma honra que não tem preço e faz todos esses anos de estudos (além dos próximos) valerem a pena.

A toda a minha família e a família Reis Blume por compreender minha ausência e mesmo assim não deixar que eu desista.

A minha orientadora, Roselene Ecco, pela credibilidade, fidelidade e paciência dispondo de tempo para me auxiliar, por ter me apoiado e incentivado a estudar Patologia Veterinária (em especial a aviária). Pessoa que admiro pelo empenho, por ser uma ótima profissional e com coração enorme.

Aos meus co-orientadores, Nelson Martins e Leonardo Lara, pelos ensinamentos, contribuições e paciência para a conclusão deste trabalho.

To UGA, especially James Stanton, Corrie Brown, Claudio Afonso and all their teams (Kelsey, Jian Zhang, Salman Butt and Kiril Dimitrov), to make possible to conclude this work and to provide the best professional and personal experience of my life.

Ao CNPq, Capes e FAPEMIG que proporcionaram suporte financeiro a mim e ao meu projeto, que com muito esforço e dedicação (do início ao fim) foi um dos contemplados.

À equipe do Laboratório de Patologia Veterinária e aos professores da UFMG por sempre me ajudar e ensinar.

E claro... ao “*Ecco Team*”, em especial a Agna, Maria Cristina, Matheus, Willian e Philipe, meus maiores presentes e minha mais nova família. O meu muito obrigada pela ajuda não só no doutorado como em todos os momentos da minha vida.

Enfim, a todos aqueles que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

“Nós nos transformamos naquilo que praticamos com frequência. A perfeição, portanto, não é um ato isolado. É um hábito.”
Aristóteles

Sumário

Lista de Tabelas	08
Lista de Figuras	09
Lista de Apêndices	11
Lista de Abreviações	12
Resumo	14
Abstract	15
Introdução	16
Objetivos	18

Capítulo I: Síndrome do definhamento e refugagem e vírus propostos como agentes etiológicos

19

Introdução	19
Sinais clínicos	20
Alterações anatomopatológicas	20
Etiologia	21
Parvovírus das galinhas	22
Rotavírus aviário	25
Astrovírus	29
Reovírus aviário	32
Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (Coronavírus)	35
Demais vírus detectados no conteúdo intestinal de aves de produção	38
Referências bibliográficas	38

Capítulo II: Estudo histopatológico associado a métodos moleculares e *in situ* em frangos de corte com a síndrome do definhamento e da refugagem

46

Abstract	46
Introdução	47
Material e métodos	48
Amostras.....	48
Cálculo para o tamanho amostral	49

Histopatologia.....	50
Morfometria.....	50
Amostras para testes moleculares.....	51
Extração de RNA.....	51
Preparação das bibliotecas do NGS.....	51
Sequenciamento de última geração (NGS).....	52
Análise do Sequenciamento.....	52
Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	53
Resultados.....	54
Histórico e sinais clínicos.....	54
Necropsia.....	55
Histopatologia.....	57
Morfometria.....	61
Avaliação e isolamento do RNA.....	61
Sequenciamento de última geração (NGS).....	62
Hibridização <i>in situ</i> (ISH).....	63
Discussão.....	64
Considerações finais.....	70
Agradecimentos.....	72
Referências bibliográficas.....	72
Apêndice 1	76

Lista de Tabelas

Capítulo II

Tabela 1.	Granjas e galpões de cada lote com o número e idade de cada ave coletada.....	42
Tabela 2.	Média do peso (em gramas) e desempenho dos pintinhos/lotos acometidos pela síndrome do definhamento e refugagem (RSS).....	48
Tabela 3.	Resumo dos vírus detectados em cada granja/lote/galpão com ou sem lesões histológicas usando sequenciamento de última geração (NGS).....	55
Tabela 4.	Resultados das semelhanças das sequências para cada um dos <i>contigs</i> separados no consenso final.....	56

Lista de Figuras

Capítulo I

- Figura 1.** Estrutura do parvovírus das galinhas (ChPV). 1) Depressões; 2) Projeções; 3) Poros. (Fonte: Berns e Parrish, 2013, modificado). 15
- Figura 2.** Fases de leitura aberta (ORF) do parvovírus das galinhas (ChPV) da extremidade 5' a 3'. aa = aminoácidos. (Fonte: Day e Zsak, 2010, modificado) 16
- Figura 3.** Desenho esquemático da estrutura do rotavírus aviário (AvRV) mostrando capsídeo contendo 11 segmentos do genoma e as proteínas virais (VP) (Fonte: Pesavento et al., 2006, modificado)..... 19
- Figura 4.** Desenho esquemático da estrutura do reovírus aviário (ARV) com suas proteínas estruturais e os 10 segmentos do material genético representados pelas letras L, M e S (Fonte: Benavente e Martínez-Costas, 2007, modificado) 25
- Figura 5.** Desenho esquemático da estrutura do vírus da bronquite infecciosa (IBV) mostrando as proteínas estruturais S1 e S2, a M é mais abundante, a E é escassa e a N representando o RNA. (Fonte: Cavanagh et al., 2005, modificado)..... 29

Capítulo II

- Figura 1.** Alterações clinicopatológicas de pintinhos com síndrome do definhamento e refugagem (RSS). A) Atraso no crescimento caracterizado pela diferença no tamanho de pintinhos de 6 dias de idade da granja Z. B) Diferença no tamanho entre pintinhos doente (esquerda) e saudável (direita) com 11 dias da granja Y. C) Pintinho de 7 dias apresentando apatia no galpão B da granja Y. D) Intestino delgado com a serosa mais esbranquiçada, lúmen distendido por gás e com conteúdo aquoso (seta). E) Alimento parcialmente digerido em secção do jejuno..... 49
- Figura 2.** Achados histopatológicos em pintinhos acometidos pela síndrome do definhamento e refugagem (RSS). A) Imagem submacroscópica do jejuno com várias criptas dilatadas. Hematoxilina e eosina (HE). B) Atrofia e fusão (seta) das

	vilosidades acentuada. HE, jejuno, 100×. C) Cripta em necrose (seta) com cariorrrexia e cariólise dos enterócitos. HE, jejuno, 400×. D) Cripta dilatada (seta) e cripta necrótica com numerosos heterófilos (asterisco). HE, jejuno, 400×. E) Múltiplas criptas com dilatação acentuada (seta) e restos celulares no lúmen. HE, jejuno, 200x. F) Criptas dilatadas caracterizadas por enterócitos achatados e lúmen preenchido por restos celulares (seta). HE, jejuno, 400×.....	51
Figura 3.	Média de criptas em necrose e dilatadas (em porcentagem) de pintinhos de seis a 11 dias de idade com lesões histológicas.....	52
Figura 4.	Células inflamatórias no jejuno de pintinhos acometidos pela síndrome do definhamento e refugagem (RSS). A) Alguns macrófagos (seta), linfócitos (asterisco) e plasmócitos (cabeça da seta) próximos a uma cripta com dilatação discreta. Hematoxilina e eosina (HE). 400×. B) Moderada quantidade de macrófagos (seta) expandindo a lâmina própria. HE, 400×.....	53
Figura 5.	Diagrama de caixa representando a altura de vilosidade e profundidade de cripta (em micrometros) de pintinhos com a síndrome do definhamento e refugagem (RSS) e saudáveis. As linhas que se estendem da caixa são os valores máximos e mínimos. O valor da mediana está representado pela linha que corta a caixa. ○ valor atípico ◇ média.....	54
Figura 6.	Marcação positiva na hibridização in situ (ISH) para <i>Gallivirus</i> (GV) na mucosa do jejuno. A) Muitas áreas/células com marcação positiva em pintinhos com lesões intestinais e positivos para GV no sequenciamento de última geração (NGS). ISH, 100×. B) Poucas áreas/células com marcação positiva em pintinhos sem lesões e negativos para o GV no NGS. ISH, 100×. C) Marcação positiva nas células epiteliais das criptas normais. ISH, 200×. D) Marcação positiva associada a folículos linfoides. ISH, 200×.....	57

Lista de Apêndices

Apêndice 1.	Certificado de aprovação do comitê de ética.....	69
--------------------	--	----

Lista de Abreviações

ANV	Vírus da nefrite aviária
ARV	Reovírus aviário
AstV	Astrovírus
AvRV	Rotavírus aviário
CastV	Astrovírus das galinhas
°C	Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
ChPV	Parvovírus das galinhas
DLP	Proteína de dupla camada (em inglês <i>double layer protein</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPI	Dias pós-infecção
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
FAdV-I	Adenovírus aviário do grupo I
FFPE	Fixado em formol e embebido em parafina (em inglês <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
G	Gramas
GP	Grupo
GV	<i>Gallivírus</i>
HE	Hematoxilina e eosina
IBV	Vírus da bronquite infecciosa
ICA	Índice de conversão alimentar
IHQ	Imuno-histoquímica
ISH	Hibridização <i>in situ</i> (em inglês <i>in situ hybridization</i>)
LAS	<i>Leica Application Suite</i>
MIN	Minutos
mRNA	RNA mensageiro
NGS	Sequenciamento de última geração (em inglês <i>next-generation sequencing</i>)
Nm	Nanômetros
NS	Proteína não estrutural
NSP	Proteína não estrutural
ORF	Fase de leitura aberta (em inglês <i>open reading frame</i>)
PCR	Reação em cadeia polimerase
PB	Pares de base
PI	Pós-infecção
RIN	Número de integridade do ácido ribonucleico (RNA)
RNA	Ácido ribonucleico
RSS	Síndrome do definhamento e da refugagem (em inglês <i>Runting Stunting Syndrome</i>)
SG	Subgrupo
SPF	Livre de patógeno específico (em inglês <i>Specific pathogen free</i>)
TA	Temperatura ambiente

TAstV-2	Astrovirus dos perus do tipo 2
TGI	Trato gastrointestinal
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VP	Proteína estrutural

Resumo

A síndrome do definhamento e da refugagem (RSS) em aves comerciais tem sido relatada mundialmente e, apesar de diversos estudos terem sido realizados para esclarecer a etiologia, ainda existem lacunas em relação aos aspectos epidemiológicos, patogênicos e etiológicos. Com o objetivo de caracterizar as lesões intestinais nos diferentes segmentos e idade de aves acometidas, além de investigar a etiologia da RSS, pintinhos naturalmente infectados apresentando atraso no crescimento, apatia, alimento mal digerido nas fezes ou diarreia foram coletados de quatro diferentes granjas comerciais localizadas em três municípios do estado de Minas Gerais. Pintinhos sem sinais clínicos foram usados como controle. O número total de pintinhos examinados foi 243. A média de peso dos pintinhos acometidos foi menor que o esperado para os lotes. Macroscopicamente, o intestino delgado dessas aves estava mais esbranquiçado, com conteúdo aquoso, mucoso ou espumoso no lúmen, além de alimento pobremente digerido. Histologicamente, havia enterite com necrose e dilatação discreta a acentuada das criptas com achatamento do epitélio. O jejuno foi o segmento mais acometido histologicamente. A morfometria revelou atrofia das vilosidades especialmente no jejuno e íleo. Alterações histológicas em outros órgãos não foram observadas. O sequenciamento de última geração (NGS) detectou vírus da nefrite aviária (ANV), rotavírus aviário (AvRV) e picornavírus em jejuno dos pintinhos de sete dias. Em pintinhos de um dia, nenhum vírus foi detectado no jejuno. A análise da sequência molecular do picornavírus revelou similaridade genética com o gênero *Gallivirus* (GV). No teste exato de Fisher, somente o GV foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$), comparando pintinhos com e sem lesão histológica. Hibridização *in situ* (ISH) para GV foi realizada e associação entre o vírus e a lesão não foi encontrada, ou seja, este vírus estava presente somente em células de criptas sem lesão histológica, embora adjacentes a estas. Pintinhos, incluindo aqueles negativos no NGS e sem lesões no jejuno, apresentaram marcação para GV na ISH, apesar desta marcação ter sido em menor número quando comparada aos animais com lesão no jejuno. Apesar da exata etiologia da RSS não ser bem compreendida e vários vírus terem sido descritos, os resultados sugerem que o GV pode desempenhar algum papel na patogênese da RSS em associação com outros vírus, como ANV e AvRV.

Palavras-chave: doença entérica, histopatologia, perda de peso, vírus, hibridização *in situ*.

Abstract

Runting Stunting Syndrome (RSS) in commercial chickens has been reported worldwide and, although several studies have been carried out to clarify the etiology, there are some gaps in relation to the epidemiological, pathogenic and etiological aspects. In order to characterize the intestinal lesions in the different segments and age from diseased chicks, in addition to investigating the etiology of RSS, naturally infected chicks presenting growth retardation, apathy, poorly digested food in the feces or diarrhea were collected from four different commercial farms located in three municipalities in the in the state of Minas Gerais. Chicks without clinical signs were used as control. The total number of examined chicks were 243. The average weight of affected chicks was lower than expected for their flocks. Macroscopically, the small intestine of these chicks had paler serosa, with a watery, mucous or foamy content in the lumen associated with poorly digested food. Histologically, there was mild to marked dilation of the crypt with flattening of the crypt epithelium and necrotic crypts. Jejunum was the segment more affected histologically. The histologic morphometry of the intestines revealed villous atrophy especially in jejunum and ileum. Histological changes in other organs were not observed. Next-generation sequencing (NGS) detected avian nephritis virus (ANV), avian rotavirus (AvRV) and picornavirus in jejunum from 7-days-old chicks. In the one-day-old chicks no viruses were detected in the jejunum. Molecular sequence analysis of the picornavirus revealed genetic similarity with *Gallivirus* (GV) genus. In Fisher's exact test, only the GV was statistically significant ($p < 0.05$), comparing chicks with and without histological lesions. In situ hybridization (ISH) for GV was performed and no association between virus and lesion was found, in other words, this virus was present only in crypt cells without histological lesion, although adjacent to them. Chicks, including those negative in NGS and without jejunal lesions, presented ISH positive signals for GV, in spite of low number of label in comparison with animals with jejunal lesions. Besides the exact etiology of RSS is not well understood and several viruses have been described, the results suggest that GV may plays a role in RSS in association with the other detected viruses, such as ANV and AvRV.

Keywords: enteric disease, histopathology, weight loss, virus, *in situ* hybridization.

Introdução

A produção de frangos é uma das atividades que se destaca mundialmente e o Brasil tem um importante papel neste cenário, sendo o segundo maior produtor de frangos de corte e o maior exportador desse produto (ABPA, 2019). Na avicultura industrial os lotes de aves são criados confinados e em alta densidade, o que pode contribuir para o aparecimento de doenças que podem resultar em perdas econômicas significativas. As doenças entéricas culminam em muitos prejuízos devido à diminuição no ganho de peso, piora da conversão alimentar e desuniformidade do lote (Barnes et al., 2000). A diversidade da microbiota intestinal dificulta diferenciar os verdadeiros patógenos que estão causando a lesão (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012). Fatores não infecciosos também podem agravar o quadro, como desequilíbrio nutricional, condições não ideais de manejo, fatores ambientais e estresse. Além disso, a idade, a genética e o estado imunológico também são importantes (Guy, 1998; Shapiro et al., 1998).

A síndrome do definhamento e refugagem (RSS, em inglês *runting stunting syndrome*), também conhecida como síndrome da má absorção ou enterite cística, acomete frangos de corte jovens com até três semanas de idade (Rebel e Balk, 2006), mas geralmente ocorre nos primeiros sete dias de vida (Otto et al., 2006; Kang et al., 2012). Os sinais clínicos geralmente são diarreia, diminuição no ganho de peso com atraso no crescimento (refugagem), empenamento anormal e mortalidade (Page et al., 1982; Kisary 1985; Zavala e Sellers, 2005). Macroscopicamente, o intestino encontra-se mais esbranquiçado e associado a conteúdo aquoso, mucoide ou espumoso com alimento pouco digerido, podendo estar distendido por gás (Rebel e Balk, 2006; Kang et al., 2012; Qamar et al., 2013; Zsak et al., 2013). Microscopicamente, há dilatação cística das criptas com achatamento do epitélio (Kouwenhoven et al., 1983), podendo estar acompanhada de atrofia e fusão de vilosidades do intestino delgado (Zavala e Sellers, 2005; Otto et al., 2006; Kang et al., 2012).

A etiologia exata da RSS ainda não está bem esclarecida, mas diversos vírus têm sido descritos como causadores dessa síndrome, como astrovírus das galinhas (CAstV) (Pantin-Jackwood et al., 2006; Kang et al., 2012; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017; Kang et al., 2018; Long et al., 2018), vírus da nefrite aviária (ANV) (Day et al., 2007; Roussan et al., 2012; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017), parvovírus das

galinhas (ChPV) (Zekarias et al., 2005; Palade et al., 2011; Devaney et al., 2016; Kapgate et al., 2018), reovírus aviário (ARV) (Goodwin et al., 1993; Banyai et al., 2010; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017), rotavírus aviário (AvRV) (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008; ter Veen et al., 2017) e vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) (Montgomery et al., 1997; Devaney et al., 2016; Hauck et al., 2016).

Recentemente, outros vírus têm sido detectados como possíveis agentes associados a RSS, como o birnavírus (Marguerie et al., 2011; Noiva et al., 2015; Lima et al., 2019), o calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), o adenovírus aviário do grupo I (FAdV-I) (Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014; De la Torre et al., 2018; Lima et al., 2019) e outros vírus pertencentes às famílias *Picornaviridae* (Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), *Siphoviridae* e *Myoviridae* (Devaney et al., 2016), *Anelloviridae*, *Circoviridae* e CRESS-DNA vírus (Lima et al., 2019).

No Brasil, a RSS foi recentemente descrita, onde foi demonstrada a infecção por um ou mais vírus (Mettifogo et al., 2014; Finkler et al. 2016a; Finkler et al. 2016b; Mascarenhas et al., 2016; Nuñez et al., 2016; De la Torre et al., 2018; Nuñez et al., 2018; De la Torre et al., 2019). Dentre esses estudos, somente um fez análise histológica, mas apenas de duodeno e pâncreas (Nuñez et al., 2016) e outro realizou sequenciamento de última geração (NGS, em inglês *Next-generation sequencing*) (Lima et al., 2019), porém a partir de fezes de aves doentes e saudáveis, sem análise histopatológica, não sendo possível confirmar neste trabalho a relação causa e efeito. Portanto, no Brasil ainda não há estudos associando a lesão histológica e a identificação dos prováveis vírus em aves naturalmente infectadas pela RSS.

Objetivos

Gerais

O objetivo deste estudo foi descrever as lesões anatomopatológicas dos segmentos de intestino de aves com RSS. Além disso, objetivou-se identificar os vírus presentes em aves doentes e saudáveis e associar a lesão histológica com o agente viral.

Específicos

1. Determinar os aspectos epidemiológicos referentes ao número de aves acometidas, idade, peso, condições de manejo e mortalidade dos lotes das granjas acometidas pela RSS;
2. Descrever as alterações macroscópicas dos intestinos e demais órgãos;
3. Determinar e descrever as alterações histológicas do intestino delgado caracterizando o tipo, a distribuição e a intensidade das lesões em cada segmento. Além disso, descrever os achados histopatológicos dos outros órgãos;
4. Realizar a avaliação morfológica das vilosidades e criptas do duodeno, jejuno e íleo para identificar a intensidade e distribuição da atrofia das vilosidades;
5. Definir por meio de sequenciamento de última geração (NGS) os vírus presentes nas amostras de frangos de corte com RSS;
6. Determinar a ocorrência de coinfeções envolvendo os vírus da RSS;
7. Realizar hibridização *in situ* (ISH) das amostras com lesão histológica de RSS em frangos de corte para associação da presença do vírus com a lesão;
8. Analisar estatisticamente os resultados, principalmente em relação à histologia, para estabelecer a relação entre a lesão e o tipo de vírus detectado.

CAPÍTULO I

Síndrome do definhamento e refugagem e vírus propostos como agentes etiológicos

Introdução

As doenças entéricas virais estão presentes na avicultura industrial, principalmente porque os lotes de aves são criados confinados e em alta densidade, o que pode levar a problemas entéricos que resultam em diminuição no ganho de peso, piora na conversão alimentar e desuniformidade do lote. Consequentemente há perdas econômicas significativas e má qualidade da carne (Barnes et al., 2000).

Essas doenças são complexas e a etiologia pode incluir um ou mais vírus, podendo estes estar associados ou não a outros agentes etiológicos. A etiologia ainda não está bem elucidada, porém tem-se discutido a interação entre diferentes vírus, onde alguns parecem possuir um papel secundário na doença (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014). e entre vírus e bactérias, como as da microbiota intestinal, onde estas podem desempenhar papel importante durante a infecção viral (Karst, 2016). A diversidade da microbiota intestinal dificulta diferenciar os verdadeiros patógenos que estão causando a lesão (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012), visto que protozoários, como os causadores das coccidioses, podem interferir na patogênese (Teirlynck et al., 2011). Fatores não infecciosos também podem agravar o quadro, como desequilíbrio nutricional, condições não ideais de manejo, fatores ambientais, como temperatura do galpão e estresse (Guy, 1998). Além disso, a idade, a genética e o estado imunológico também são importantes (Guy, 1998; Shapiro et al., 1998).

A enterite viral afeta pintinhos e tem sido relatada em muitos países, incluindo o Brasil, com perdas econômicas graves e devastadoras. Os pintinhos acometidos apresentam letargia, têm diarreia ou alimento mal digerido nas fezes. Tudo isso contribui para uma doença chamada síndrome do definhamento e da refugagem (RSS, em inglês *runting stunting syndrome*) e resulta em prejuízos significativos devido à diminuição do crescimento (Montgomery et al., 1997; Hauck et al., 2016).

A RSS, também conhecida como síndrome da má absorção ou enterite cística, foi descrita pela primeira vez no final da década de 1940 (Robertson et al., 1949), porém só a

partir da década de 1970 se tornou mais recorrente (Olsen, 1977; Kouwenhoven et al., 1983) e passou a ser mais estudada experimentalmente (Smart et al., 1988). A RSS acomete principalmente frangos de corte jovens e é caracterizada microscopicamente por enterite com dilatação cística das criptas (Kouwenhoven et al., 1983), sendo também chamada de enterite cística viral (Sellers et al., 2009).

Vacina contra RSS nunca foi desenvolvida devido à complexidade da etiologia dessa síndrome. O controle da RSS inclui boas práticas de manejo como manejo correto da cama (troca ou tratamento pelo calor para reutilização), limpeza e desinfecção dos galpões, respeito às condições de conforto ambiental para as aves, biosseguridade adequada e, em alguns casos, uso de antimicrobianos para reduzir infecções bacterianas (Barnes e Guy, 2003).

Sinais clínicos

Os sinais clínicos geralmente são diarreia, diminuição no ganho de peso com atraso no crescimento (refugagem), empenamento anormal, desuniformidade do lote e mortalidade (Page et al., 1982; Kisary 1985; Zavala e Sellers, 2005).

Alterações anatomopatológicas

Macroscopicamente, os pintinhos possuem perda da pigmentação, onde a carcaça está pálida, com condição corporal pobre (Frazier et al., 1990; Rebel et al., 2006). O intestino encontra-se mais pálido que o normal, com conteúdo aquoso, mucoide ou espumoso com alimento pouco digerido, podendo estar distendido por gás (Rebel e Balk, 2006; Zsak et al., 2013). Em alguns casos pode haver atrofia da bolsa cloacal (Qamar et al., 2013).

Microscopicamente, ocorre necrose dos enterócitos das criptas e dilatação da cripta com achatamento do epitélio (Kouwenhoven et al., 1983), alteração que originou também o a denominação enterite cística viral para esta doença (Sellers et al., 2009). Consequentemente há atrofia e fusão das vilosidades do intestino delgado (Zavala e Sellers, 2005; Otto et al., 2006; Kang et al., 2012).

Etiologia

A etiologia exata da RSS não está bem elucidada, mas sabe-se que é causada por agentes virais e diversos vírus têm sido estudados e sugeridos como etiologia desta síndrome. Os principais vírus que foram relacionados como possíveis causadores da RSS são astrovírus das galinhas (CAstV) (Pantin-Jackwood et al., 2006; Kang et al., 2012; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017; Kang et al., 2018; Long et al., 2018), vírus da nefrite aviária (ANV) (Day et al., 2007; Roussan et al., 2012; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017), parvovírus das galinhas (ChPV) (Zekarias et al., 2005; Palade et al., 2011; Devaney et al., 2016; Kapgate et al., 2018), reovírus aviário (ARV) (Goodwin et al., 1993; Banyai et al., 2010; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017), rotavírus aviário (AvRV) (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008; ter Veen et al., 2017) e vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) (Montgomery et al., 1997; Devaney et al., 2016; Hauck et al., 2016).

Estudos mais recentes têm encontrado outros vírus associados à RSS, como o birnavírus (Marguerie et al., 2011; Noiva et al., 2015; Lima et al., 2019), o calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), o adenovírus das galinhas do grupo I (FAdV-I) (Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014; Lima et al., 2019) e outros vírus pertencentes às famílias *Picornaviridae* (Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), *Siphoviridae* e *Myoviridae* (Devaney et al., 2016), *Anelloviridae*, *Circoviridae* e CRESS-DNA vírus (Lima et al., 2019).

Alguns estudos já detectaram em aves saudáveis o astrovírus (Jindal et al., 2011; Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016), AvRV (Reynolds et al., 1987; Jindal et al., 2009; Jindal et al., 2012; Mettifogo et al., 2014), ChPV (Zsak et al., 2009; Palade et al., 2011; Devaney et al., 2016), ARV (Robertson et al., 1984; Devaney et al., 2016) e IBV (Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016), dificultando compreender o papel do agente na etiologia e patogenicidade da RSS. Há ainda casos em que o vírus isolado não foi capaz de reproduzir a doença experimentalmente (Pantin-Jackwood et al., 2008; Zsak et al., 2009; Spackman et al., 2010). Com isso, surgiu a hipótese de que a doença pode ser causada pela associação de um ou mais vírus ou da interação do agente com outros fatores que contribuam para o processo patogênico da doença (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan

et al., 2012). Além disso, outros fatores são citados como a temperatura do galpão, estresse (Guy, 1998) e uso de antimicrobianos (Mundt et al., 2015).

Casos de coinfeções com outros vírus entéricos resultando na doença foram relatados, como com o astrovírus (Pantin-Jackwood et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2008; Sellers et al., 2010; De Wit et al., 2011; Jindal et al., 2011; De la Torre, et al., 2018) e ARV (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014) sugerindo que esses vírus possam induzir a doença entérica. O IBV aparentemente pode causar a doença estando associado ou não a outros vírus ou agentes bacterianos (Montgomery et al., 1997; Pantin-Jackwood et al., 2008; Mettifogo et al., 2014; Hauck et al., 2016).

Parvovírus das galinhas

O parvovírus das galinhas (ChPV) é membro da família *Parvoviridae* e subfamília *Parvovirinae* (Day e Zsak, 2010). É um vírus icosaédrico, não-envelopado, fita simples de DNA e com 25 nm de diâmetro (Tattersall, 2006). No capsídeo há regiões de depressões (*dimples*), espículas ou projeções (*spikes*) e depressões arredondadas semelhantes a poros (*canyons*) (Figura 1) (Agbandje et al., 1995). As regiões de depressões são responsáveis pelo reconhecimento e pela ligação do vírus a célula do hospedeiro e as projeções determinam as características imunogênicas, sendo sítios onde se ligam os anticorpos antivirais (Berns e Parrish, 2013).

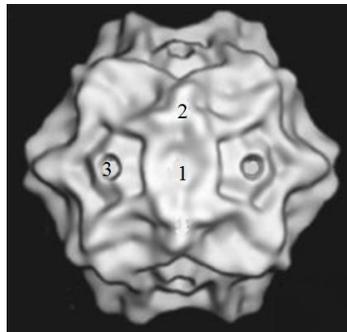


Figura 1. Estrutura do parvovírus das galinhas (ChPV). 1) Depressões; 2) Projeções; 3) Poros. (Fonte: Berns e Parrish, 2013, modificado).

O capsídeo é formado pelas proteínas estruturais VP1, VP2 e VP3, codificadas pela fase de leitura aberta (ORF, em inglês *open reading frame*) da extremidade 3', com exceção da VP3 que é resultado da clivagem da proteína VP2 (Day e Zsak, 2010). Essas proteínas

são responsáveis pela produção de anticorpos neutralizantes durante a infecção (Saikawa et al., 1993). A proteína VP2 é o local de tropismo do vírus pela célula hospedeira, sendo receptor de ligação do vírus com a célula hospedeira e epítipo de ligação com anticorpos. A proteína VP1 tem atividade enzimática e fica exposta durante a entrada do vírus na célula, agindo como localizador do núcleo celular e no momento da formação do capsídeo (Berns e Parrish, 2013). A ORF da extremidade 5' codifica a proteína não estrutural NS1 (Day e Zsak, 2010) que é importante para iniciar a replicação do ChPV (Zsak et al., 2008). A ORF situada entre as duas ORFs citadas anteriormente parece gerar uma proteína nuclear hiperfosforilada conhecida como NP1 (Figura 2) (Day e Zsak, 2010).

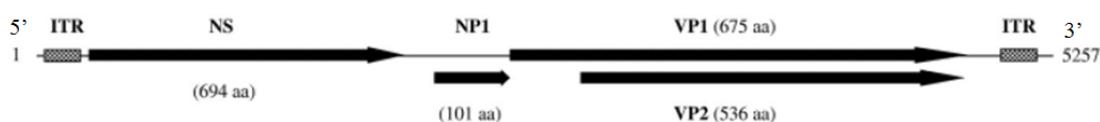


Figura 2. Fases de leitura aberta (ORF) do parvovírus das galinhas (ChPV) da extremidade 5' a 3'. aa = aminoácidos. (Fonte: Day e Zsak, 2010, modificado).

A replicação viral ocorre em células com alto grau de proliferação, pois o ChPV depende da fase S do ciclo mitótico celular para a duplicação do DNA, pois nesta fase há expressão de fatores necessários para o processo (Moraes e Costa, 2012; Berns e Parrish, 2013). Portanto, as células de predileção para infecção viral são as da cripta do intestino e as células linfoides (Muzyczka e Berns, 2001). Para comprovar essa predileção, um estudo experimental realizou reação em cadeia polimerase (PCR) do gene NS em aves e observou que dos 7 aos 35 dias após a inoculação ainda foi possível detectar o ChPV no intestino delgado, baço e bolsa cloacal, porém não houve detecção no timo (Day e Zsak, 2013).

O vírus ao entrar no hospedeiro se liga ao enterócitos em maturação por meio da proteína VP2 e entra na célula por meio de endocitose, formando vesículas endocíticas o qual transportarão as partículas virais para próximo do núcleo celular. Juntamente a esse processo há alteração das proteínas do capsídeo viral e exposição da proteína VP1 que auxiliará no direcionamento da partícula viral para o núcleo celular (Boisvert et al., 2010; Moraes e Costa, 2012; Berns e Parrish, 2013). No núcleo existem poros de até 39 nm de diâmetro o qual permitem a entrada da partícula viral intacta ou semi-integras (Berns e Parrish, 2013). O segmento de DNA é transcrito em RNA mensageiro (mRNA) e no retículo endoplasmático ocorre a produção de proteínas virais e há replicação do material

genético viral. Após a tradução em proteínas virais, estas são transportadas para o núcleo para morfogênese viral. O vírus formado é então liberado por lise das células infectadas. Devido a lise ou necrose das células da cripta pela ação do vírus, há redução dos microvilos e da capacidade de absorção de nutrientes e a ave apresenta sinais típicos da RSS (Moraes e Costa, 2012; Berns e Parrish, 2013).

Imuno-histoquímica revelou marcação do núcleo de enterócitos principalmente no duodeno (Day e Zsak, 2013) e, além do núcleo de enterócitos, em núcleo de células inflamatórias na lâmina própria do duodeno e jejuno (Palade et al., 2011). Essa marcação positiva do núcleo confirma a predileção do ChPV pelo núcleo celular (Palade et al., 2011; Day e Zsak, 2013).

O ChPV infecta a ave por contato direto por via oro-fecal ou pela inalação de aerossóis contendo partículas virais viáveis (Muzyczka e Berns, 2001). A idade dos frangos de corte infectados varia de 1 a 45 dias, sendo sugerida transmissão vertical desse vírus (Day e Zsak, 2010; Tarasiuk et al., 2012). A maior concentração do ChPV em frangos de corte ocorre entre 3 a 6 semanas de vida e em poedeiras entre 14 a 21 semanas (Tarasiuk et al., 2012).

Os sinais clínicos apresentados por frangos infectados por ChPV incluem diarreia aquosa e amarelada, diminuição no ganho de peso e conseqüentemente retardo no crescimento, empenamento anormal e aumento da mortalidade diária (Kisary, 1985; Palade et al., 2011; Day e Zsak, 2013). Sinais clínicos como retardo na eclosão e desordens ósseas também já foram descritas em casos de inoculação de ChPV em embriões ou em pintinhos de 1 dia (Kisary, 1984). Estudo experimental revelou que a diarreia e o retardo no crescimento eram evidentes principalmente entre 4 a 7 dias após a inoculação viral (Day e Zsak, 2013). Em contrapartida outro estudo mostrou que a diferença mais significativa de peso era vista com 3 a 4 semanas após a infecção (Kisary, 1985).

Macroscopicamente há aumento de conteúdo fluido a mucoide com distensão por gás do intestino delgado (Palade et al., 2011; Day e Zsak, 2013). Além disso, pode haver dilatação e conteúdo aquoso no ceco (Day e Zsak, 2013), dilatação dos vasos sanguíneos do intestino e mesentério, coloração levemente avermelhada da mucosa do duodeno e jejuno e atrofia dos órgãos linfoides como bolsa cloacal, timo e baço (Palade et al., 2011).

Estudos com análise histológica são escassos, porém um trabalho com frangos de 2 a 21 dias revelou moderada a acentuada dilatação das criptas intestinais, enterite catarral com predomínio de linfócitos e macrófagos no duodeno e jejuno e pouca descamação de enterócitos, porém sem atrofia de vilosidades. Ainda houve pancreatite nodular linfocitocitária (Palade et al., 2011). Importante ressaltar que essas aves eram naturalmente infectadas e por isso algumas também tinham coinfeção por astrovírus (ANV e CAstV) e/ou ARV. Atrofia de pâncreas, bolsa cloacal e esplênica também já foram descritas (Zsak et al., 2013; Nuñez et al., 2016).

O ChPV tem distribuição mundial, sendo encontrado em vários estados dos Estados Unidos (Zsak et al., 2009), em países europeus como Hungria (Palade et al., 2011), Polônia (Tarasiuk et al., 2012; Domanska-Blicharz et al., 2012), Croácia (Bindin et al., 2011), Inglaterra (Devaney et al., 2016), na Ásia como na Coreia do Sul (Koo et al., 2013) e China (Feng et al., 2016), Canada (Fountain et al., 2011) e Brasil (Mettifogo et al., 2014; Nuñez et al., 2015).

Rotavírus aviário

O rotavírus aviário (AvRV) pertence à família *Reoviridae* e subfamília *Sedoreovirinae*. É um vírus não-envelopado, icosaédrico, de camada tripla e mede cerca de 100 nm incluindo suas projeções de aderência celular VP4 (Jiang et al., 2008; Pesavento et al., 2006). Esse vírion é composto por 11 segmentos de fita dupla de ácido ribonucléico (RNA) envolvido por um triplo capsídeo viral formado por um núcleo central ou *core*, capsídeos interno e externo (Estes e Cohen, 1989). Cada segmento codifica uma única proteína, estrutural ou não, com exceção do décimo primeiro segmento que codifica duas (Jiang et al., 2008).

As proteínas estruturais (VP) são VP1 a VP4, VP6 e VP7, codificadas pelo segmento 1 a 4, 6 e 9 respectivamente, e as não estruturais (NSP) são NSP1 a NSP6, codificadas pelo segmento 5, 8, 7, 10 respectivamente, sendo que o segmento 11 codifica a NSP5 e NSP6. As proteínas não estruturais são encontradas em partículas virais durante a infecção (Estes e Kapikian, 2007). As proteínas VP1, VP2 e VP3 constituem o *core* ou núcleo central e estão relacionadas com o revestimento do genoma viral. A VP6 compõe o capsídeo interno e a VP4 e VP7 formam o capsídeo externo. A VP4 ao ser clivada por

enzimas proteolíticas origina a VP5 e a VP8 que possuem importante papel no reconhecimento do receptor (Figura 3) (Estes e Cohen, 1989).

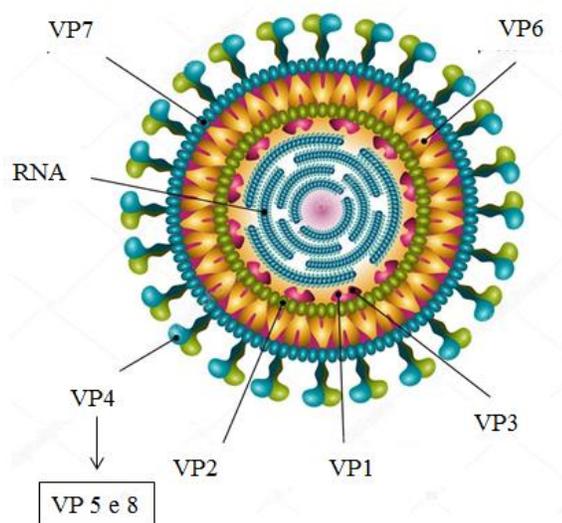


Figura 3. Desenho esquemático da estrutura do rotavírus aviário (AvRV) mostrando capsídeo contendo 11 segmentos do genoma e as proteínas virais (VP) (Fonte: Pesavento et al., 2006, modificado).

A VP1 tem função de transcrição e replicação viral, atuando como RNA polimerase, mas é ativa apenas na presença da VP2, sendo esta, portanto, importante para a replicação genômica. A VP3 desempenha papel de guanililtransferase e transporta a fita simples de RNA que será molde para a fita dupla de RNA (Kapikian, 2001; Matthijnsens et al., 2008; King et al., 2012). A VP6 é uma proteína conservada utilizada para a classificação do rotavírus em grupos, de A a G, e subgrupos, SG I, SG II ou SG I e II, (King et al., 2012) e está indiretamente relacionada com a transcrição juntamente com a VP1 (Charpilienne et al., 2002). A VP4 é responsável pela ligação do vírus com a célula hospedeira e ao ser clivada por enzimas proteolíticas origina os peptídeos VP5 e VP8 (Estes e Cohen, 1989). Esses peptídeos aumentam a infectividade e aumentam a estabilidade da espícula devido a alterações conformacionais (King et al., 2012). A VP7 induz formação de anticorpos neutralizantes da partícula viral (Mattion et al., 1994).

Em relação a proteínas não estruturais, a NSP1 está envolvida no ciclo de replicação do vírus e patogênese viral porque inibe a resposta imune inata do hospedeiro suprimindo a indução de morte celular durante os estágios iniciais da infecção (Patton et al., 2007). A

NSP2 tem função na replicação do genoma viral e ao interagir com a NSP5 atua na formação do viroplasma (Taraporewala e Patton, 2001). A NSP3 se liga ao RNA viral e regula a tradução (Estes e Kapikian, 2007). A NSP5 atua na formação dos viroplasmas e replicação do genoma viral, mas a função da NSP6 ainda não está bem elucidada (King et al., 2012), sabe-se, contudo que a NSP6 é degradada dentro de aproximadamente duas horas após sua síntese (Rainsford e Mccrae, 2007). A NSP4 é a única proteína não estrutural que não se liga ao RNA, sendo sintetizada na membrana do retículo endoplasmático (Mori et al., 2002; Chacko et al., 2011). Essa proteína tem função no estabelecimento da doença e na infectividade dos enterócitos, tendo efeito de enterotoxina (Zhang et al., 1998; Kirkwood et al., 1999; Pager et al., 2000) e é uma das proteínas determinantes de virulência (Mascarenhas et al., 2007). A NSP4 tem amplo tropismo celular, tendo maior efeito molecular nos hospedeiros, estando envolvida na patofisiologia da doença (Didsbury et al., 2011).

O AvRV é excretado nas fezes e a transmissão ocorre de forma horizontal por via oral ou por contato direto (McNulty et al., 1983). Na patogênese do AvRV, tanto o AvRV como o RV de mamífero possuem como células-alvo os enterócitos maduros. Após a ingestão de alimento contaminado, o vírus se adere a célula hospedeira por meio da proteína VP4 e o capsídeo externo é perdido com a entrada do agente no enterócito. O vírus pode entrar na célula por endocitose ou por penetração direta pela membrana. Nesta etapa, a VP7 interage com a superfície celular após a ligação dos enterócitos com as espículas (King et al., 2012). O vírus no interior do citoplasma celular sofre ação de enzimas lisossomais e perde o capsídeo externo composto da VP4 e VP7, resultando na liberação de uma DLP (em inglês *double layer protein*) que são partículas de duplo capsídeo que promovem a síntese de uma fita molde de RNA para síntese do genoma do RNA de fita dupla (Arias et al., 1996).

O processo de replicação ocorre no citoplasma e inicia-se com a proteína VP1 por meio da modulação de transcritos de RNA viral que funcionam como RNA mensageiros (mRNA) e como molde para síntese do genoma viral (Kapikian, 2001). A proteína viral VP6 parece ser necessária na síntese do mRNA juntamente com a VP1, visto que a ausência da VP6 torna a VP1 não funcional (Charpilienne et al., 2002). Há formação de grande quantidade de proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) e não estruturais (NSP2 e

NSP5) resultando em inclusões intracitoplasmáticas chamadas de viroplasmas. No interior dos viroplasmas ocorre a replicação do genoma, síntese do *core* ou núcleo central e morfogênese de novas partículas virais (Estes e Kapikian, 2007). As partículas virais recém-formadas possuindo apenas dupla camada saem do viroplasma e entram no retículo endoplasmático rugoso por brotamento por meio da ação da proteína NSP4, constituindo um envoltório lipídico onde será sintetizado a VP7. Durante esse processo a NSP4 tem papel de receptor para adição da VP7 e VP4, formando o capsídeo externo. Finalmente o vírus sai do enterócito por lise celular ou exocitose (Arias et al., 1996; Patton et al., 2007).

No hospedeiro, uma das causas da diarreia além da má absorção por lesão das vilosidades por lise celular, principalmente do topo das vilosidades (McNulty et al., 1983), é o aumento dos níveis de cálcio intracelular e diminuição de cloreto devido a ativação dos canais dependentes de cálcio pela ação da NSP4 (Gibbons et al., 2011). Além disso, essa mesma proteína altera as concentrações intracelulares de íons quando inseridas na membrana plasmática, interferindo na homeostase do cálcio (Hyser et al., 2010).

O rotavírus pode ser dividido em grupos de A a G (Otto et al., 2006) e aves se infectam pelo grupo A, assim como humanos e outros mamíferos, e grupos D, F e G, sendo estes exclusivos de aves (Otto et al., 2012). As diferentes estirpes de rotavírus dificulta a produção de vacinas contra AvRV (Borgan et al. 2003). Além disso, também podem ter variação no local de replicação, onde o AvRV do grupo A infecta principalmente o duodeno das galinhas, enquanto o do grupo D o jejuno e o íleo (McNulty et al., 1983).

O AvRV acomete não só frangos como também perus, codornas, faisões, perdizes, patos, papagaios, periquitos e pombos (Battilani et al., 2003). A idade de acometimento varia de 2 dias a 6 semanas de vida, sendo mais comum a ocorrência com até 1 semana de idade (Jindal et al., 2009). O período de incubação do AvRV varia de 1 a 5 dias (Yason e Schat, 1986). Os sinais clínicos são diarreia leve a severa, diminuição no ganho de peso com retardo no crescimento (Otto et al., 2006; Matthijssens et al., 2008), desidratação e aumento da mortalidade, porém pode haver casos de aves assintomáticas (Matthijssens et al., 2008). As alterações macroscópicas podem estar ausentes (Yason e Schat, 1986; Jindal et al., 2009) e quando presentes são caracterizadas por paredes intestinais esbranquiçadas associada a grande quantidade de fluído e gás no intestino e ceco, atrofia do pâncreas e da bolsa cloacal e, em alguns casos, raquitismo (Lublin et al. 2004).

As lesões histológicas descritas foram encontradas somente no intestino delgado e incluem moderada a acentuada atrofia de vilosidades, fusão do ápice das vilosidades e diminuição das células da superfície do epitélio. A proporção de vilosidade e cripta em casos severos pode ser de 1:1 ou 1:2. Nas criptas há hiperplasia ou dilatação e células apoptóticas podem estar associadas à atrofia de vilosidade e hiperplasia de cripta. Importante ressaltar que atrofia da vilosidade é observada principalmente quando a infecção é pelo AvRV do grupo D (Otto et al., 2006). Em um estudo experimental, os pintinhos de 1 ou 8 dias de idade inoculados com AvRV tiveram moderada atrofia de vilosidades principalmente no íleo e infiltrado de células mononucleares principalmente no jejuno e íleo três dias após inoculação (Meulemans et al., 1985).

O AvRV tem distribuição mundial e foi inicialmente detectado nos Estados Unidos e posteriormente na união europeia (McNulty et al., 1978). Também há relatos em países como Alemanha (Otto et al., 2006), Egito (Hemida, 2013), Brasil (Mettifogo et al., 2014), Nigéria (Stucker et al., 2015), Bangladesh (Ahmed e Ahmed, 2006) e Índia (Kattoor et al., 2013).

Astrovírus

Os astrovírus (AstVs) pertencem à família *Astroviridae* e gênero *Avastrovirus*, não são envelopados, icosaédricos, composto por fita simples de RNA, medem de 25 a 30 nm de diâmetro e possuem essa nomenclatura por se assemelharem a uma estrela de 5 ou 6 pontas na microscopia eletrônica (Reynolds e Schultz-Cherry, 2008). O astrovirus é composto por três fases de leitura aberta (ORF, em inglês *open reading frame*). A ORF 1a e a ORF 1b que codificam uma proteína não estrutural, a NSP1ab, onde a cadeia polipeptídica NSP1a é uma protease viral e a NSP1b é uma RNA polimerase-RNA dependente (Jiang et al., 1993). ORF2 que codifica uma proteína precursora do capsídeo formada por três cadeias polipeptídicas, sendo estas as responsáveis pela formação das projeções na estrutura do vírus que interagem com o sistema imunológico do hospedeiro. A ORF2 é a região mais variável do genoma (Monceyron et al., 1997).

Existem dois AstVs segundo sua origem e suas características genômicas, o astrovírus das galinhas (CAstV) e o vírus da nefrite aviária (ANV) (Pantin-Jackwood et al., 2010), O ANV possui três sorotipos, o ANV-1, ANV-2 (Takase et al., 1989) e,

recentemente foi descoberto um terceiro sorotipo, o ANV-3 (de Wit et al., 2011). Tanto o CAstV quanto o ANV-1 e o ANV-2 já foram descritos em frangos de corte acometidos por RSS (Kang et al., 2012). O ANV já foi detectado em perus (Domanska-Blicharz et al., 2011) e patos (Bidin et al., 2011). O CAstV foi descrito anteriormente como um vírus tipo enterovírus (ELV, em inglês *enterovirus-like virus*) (McNeilly et al., 1994). O ANV inicialmente foi classificado como pertencente ao gênero *Enterovirus* da família Picornaviridae por apresentar características semelhantes a um enterovírus, mas posteriormente foi classificado como um astrovírus (Imada et al., 2000). Baseado nas sequências do gene não estrutural ORF1a, o ANV pode ser dividido em três genótipos (Mandoki et al., 2006).

Um estudo experimental em perus mostrou que as aves começaram a apresentar diarreia 2 dias após inoculação do vírus (Mor et al., 2011), enquanto em frangos foi com 4 dias após infecção (Baxendale e Mebatsion, 2004). Os AstVs são encontrados em aves de todas as idades (de Wit et al., 2011) e podem infectar a ave ainda quando esta é um embrião, principalmente quando a imunidade ainda é pouco desenvolvida, mas também o vírus pode ser transmitido horizontalmente (Smyth, 2017).

Aves infectadas por ANV podem apresentar um quadro subclínico ou de nefropatia em pintinhos (Franzier et al., 1990; Mandoki et al., 2006), retardo no crescimento e aumento da mortalidade (Connor et al., 1987). O ANV já foi detectado em aves saudáveis (Connor et al., 1987) e até em aves livres de patógenos específicos (SPF em inglês *specific-pathogen-free*) (McNulty et al., 1989). Os sinais clínicos associados ao CAstV são diarreia com má digestão (de Wit et al., 2011) e quando mais severos podem levar a morte (Baxendale e Mebatsion, 2004).

Não há relatos de lesões macroscópicas no intestino relacionadas diretamente com os AstVs. Alguns estudos com astrovírus dos perus do tipo 2 (TAstV-2) relatam não haver lesões microscópicas no intestino (Koci et al., 2003; Nighot et al., 2010), e lesão discreta foi descrita somente na bolsa cloacal (Tang et al., 2006). Um estudo experimental com CAstV mostrou que este vírus dificilmente causa lesão microscópica, mas quando presente é caracterizada por discreta dilatação de cripta (Kang et al., 2018). Outro trabalho experimental em poedeiras revelou diarreia discreta com lesão limitada nas vilosidades do intestino delgado (Baxendale e Mebatsion, 2004). Em relação ao ANV, aves de 8 a 11 dias

de idade podem ter lesões macroscópicas caracterizadas por rins vermelho-pálidos, aumentados de tamanho e com deposição de urato principalmente nos ureteres. Enquanto microscopicamente há infiltrado intersticial de células mononucleares e degeneração de alguns túbulos e acúmulo de cristais de urato (Hewson et al., 2010).

Experimento desafiando pintinhos recém-nascidos de corte ou livres de patógenos (SPF) com estirpes de CAstV obtidas por cultivo e isolamento resultou em diferentes graus de definhamento, provavelmente devido a abrangente patogenicidade encontrada neste vírus RNA. Além disso, as inoculações com isolados de CAstV não causaram definhamento total tipicamente observados na RSS, onde aves jovens podem apresentar menos de 50% do seu peso esperado com duas a três semanas de idade, sugerindo que pode haver outros agentes ou outros fatores envolvidos (McNeilly et al., 1994). Outro estudo de patogenicidade em pintinhos (SPF) com duas das 25 estirpes existentes, CAstV 612 e FP3, detectou infecção pelo vírus no duodeno, jejuno e íleo, bem como na região colorretal. Ambos os vírus também foram detectados no fígado, rins e baço. Os efeitos do CAstV 612 foram discretos e do CAstV FP3 resultou em lesões intestinais no primeiro dia depois da infecção (d.p.i). Consequentemente, a partir do terceiro d.p.i havia alteração na proporção vilosidade:cripta, além de infecção do primeiro ao oitavo d.p.i nos rins (Smyth et al., 2007).

Outro estudo com inoculação do CAstV em pintinhos de 1 dia revelou que esse vírus inicialmente não foi capaz de promover alterações patológicas, somente após quatro passagens de ave para ave que estas tiveram sinais clínicos de retardo no crescimento e após três passagens houve dilatação cística na histologia. Este estudo também mostrou que o CAstV tem replicação preferencialmente em células imaturas do epitélio da cripta e esta inicia em menos de 24h após a inoculação do vírus (Kang et al., 2018).

Os AstVs têm distribuição mundial. O ANV, por exemplo, já foi descrito no Japão (Imada et al., 1980), em alguns países da Europa (Connor et al., 1987; Nicholas et al., 1988; Mandoki et al., 2006), na Austrália (Hewson et al., 2010), nos Estados Unidos (Pantin-Jackwood et al., 2010) e no Brasil (Mettifogo et al., 2014; De la Torre, et al., 2018; Lima et al., 2019). Enquanto o CAstV foi descrito nos Estados Unidos (Canelli et al., 2012), Europa (Baxendale e Mebatsion, 2004; ter Veen et al., 2017), Canadá (Long et al., 2018) e Brasil (Espinoza et al., 2016; De la Torre, et al., 2018; Lima et al., 2019).

Reovírus aviário

O reovírus (ARV) pertence ao gênero *Orthoreovirus* e família *Reoviridae* e é formado por 10 segmentos de fita dupla de RNA. O vírion é não-envelopado, icosaédrico, com dupla camada e mede aproximadamente 80 nm de diâmetro (Jones, 2013). Os 10 segmentos são divididos em classes de tamanho como L, de grande (*large*), que contém três segmentos (L1, L2 e L3), classe M, de médio (*medium*), também com três segmentos (M1, M2 e M3) e classe S, de pequeno (*small*), com quatro segmentos (S1, S2, S3 e S4) (Spandidos e Graham, 1976). As classes de segmento L, M e S codificam proteínas estruturais classificadas como λ (lambda), μ (mu) e σ (sigma), respectivamente (Spandidos e Graham, 1976; Benavente e Martínez-Costas, 2007) (Figura 4). As proteínas estruturais além de serem classificadas com uma letra grega, possuem uma letra do alfabeto, diferindo do reovírus dos mamíferos que é acompanhado por número (Benavente e Martínez-Costas, 2007).

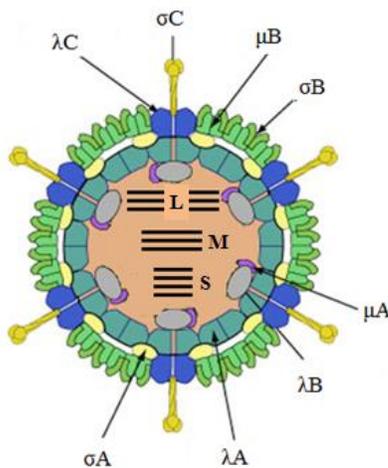


Figura 4. Desenho esquemático da estrutura do reovírus aviário (ARV) com suas proteínas estruturais e os 10 segmentos do material genético representados pelas letras L, M e S (Fonte: Benavente e Martínez-Costas, 2007, modificado).

Há pelo menos 10 proteínas estruturais, oito produtos de tradução primária dos seus mRNA (λ A, λ B, λ C, μ A, μ B, σ A, σ B e σ C) e duas da clivagem pós-transducional de seu precursor μ B (μ BN e μ BC) (Varela et al., 1996). As proteínas estruturais que constituem o capsídeo interno são a λ A, que serve de base para a montagem do vírus, λ B, que atua como transcriptase, μ A, que serve como cofator para transcriptase, e a σ A, que se liga a dupla fita

de RNA e promove resistência do ARV à atividade antiviral do interferon (Benavente e Martínez-Costas, 2007). Além disso, acredita-se que a proteína σA tem função na morfogênese do ARV (Yin et al., 2000; Xu et al., 2004; Vázquez-Iglesias et al., 2009). A proteína do capsídeo externo é μB (com a μBN e μBC), com papel de penetração do vírus e ativação da transcriptase, a σB , com função ainda desconhecida, e a σC , que promove a ligação à célula (Benavente e Martínez-Costas, 2007). A proteína estrutural λC se estende do capsídeo interno até o externo, formando estruturas semelhantes a torres, cuja função é de ligação com o RNA viral (Martínez-Costas et al., 1997; Zhang et al., 2005).

As proteínas não estruturais são a μNS e a σNS , codificadas pelo segmento M3 e S4 respectivamente, encontradas no citoplasma de células infectadas (Varela e Benavente, 1994). A função da μNS é formar o vírus e recrutar proteína e a da σNS é ligar ao RNA. Além dessas proteínas não estruturais, há a p10 e p17, ambas provenientes do segmento S1 (Shmulevitz et al., 2002). A função da p17 ainda é desconhecida, enquanto a da p10 é de fusão e permeabilidade celular (Bodelon et al., 2002).

Os primeiros órgãos atingidos após a infecção pelo ARV são o intestino e a bolsa cloacal. O processo de replicação inicia na mucosa do sistema digestório e quando ocorre o pico de viremia, cerca de 24 a 48 horas após a infecção, o vírus encontra-se disseminado por praticamente todos os órgãos (Menendez et al., 1975; Ellis et al., 1983), persistindo por longos períodos nos órgãos linfóides, oviduto e articulações (Alfieri, 1989). O vírus se dissemina por quase todos os órgãos porque depois de se replicar no epitélio intestinal atinge a circulação sanguínea por meio das placas de Peyer (Vasconcelos et al., 2001).

A transmissão é horizontal por via oral e há relato de transmissão vertical em caso de tenosinovite (Van der Heide e Kalbac, 1975). Após a ingestão de água ou alimento contaminado por fezes, o ARV se adere às células do hospedeiro por meio da interação dos receptores da superfície celular e da proteína σC (Grande et al., 2000). Esses receptores da célula hospedeira ainda não estão bem elucidados, mas devido ao fato do ARV também se ligar e replicar na maioria das células de mamíferos, acredita-se que o receptor do ARV seja uma proteína de superfície celular ubíqua (Robertson e Wilcox, 1986). O vírus entra na célula por meio de endocitose e o vírus fica dentro de um endossoma, onde ocorrerá um processo proteolítico com consequente perda do capsídeo externo, liberando a proteína μBC que será clivada e formará dois produtos, o δ e o δ' , cuja função ainda é desconhecida

(Duncan, 1996). Após a perda do capsídeo externo, a partícula viral é liberada para o citoplasma, onde ocorrerá a transcrição do genoma viral. Esse processo se inicia com a produção de 10 mRNA virais, estes promovem a tradução de proteínas virais nos ribossomos e são utilizados como molde para síntese de um genoma menos vertente (Nibert e Schiff, 2001). O processo de morfogênese do ARV ocorre exclusivamente no interior de estruturas como se fossem fábricas virais e a incorporação de polipeptídeos e de partículas virais são bem controladas, processo que dura cerca de uma hora (Tourís-Otero et al., 2004). O mecanismo exato desse processo ainda não está bem esclarecido. Assim como o de liberação do vírus por meio da lise da célula infectada. Acredita-se que a proteína não estrutural p10 desempenha papel fundamental na liberação e disseminação de vírus, devido sua atividade de permeabilização e fusão celular (Bodelon et al., 2002). Além da lise celular, sugere-se que o ARV também induz apoptose (Labrada et al., 2002).

Em frangos, esse vírus pode causar tenosinovite/artrite viral, doença respiratória, imunossupressão e doenças entéricas como RSS (Rosenberger, 2003). Porém, acredita-se que o ARV desempenha um papel secundário na RSS (Decaesstecker et al., 1986; Goodwin et al., 1993; Montgomery et al. 1997; van Loon et al., 2001), visto que alguns estudos observaram que o ARV geralmente é encontrado em aves infectadas concomitantemente com outros vírus (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014).

Há vacinas comerciais para ARV, porém devido ao complexo etiológico da RSS, estas podem não proteger contra a RSS (Jones, 2013). Em contrapartida, um estudo revelou que a vacinação contra ARV mostrou-se ser eficaz no controle da RSS, diminuindo a amenizando a gravidade da doença (Awandkar et al., 2017).

O ARV acomete tanto frangos de corte quanto galinhas poedeiras, patos, gansos, perus, dentre outros (Majumder et al., 2018). As aves podem ter ARV desde seu nascimento até cerca de 36 dias de idade (Davis et al., 2013). O período de incubação varia de 3 a 4 dias após a infecção (Montgomery et al., 1997). Os sinais clínicos podem ser inespecíficos como letargia (Montgomery et al., 1997) e aumento da mortalidade (Goodwin et al., 1993), ou as aves apresentarem retardo no crescimento com alimento mal digerido nas fezes (Goodwin et al., 1993; Montgomery et al., 1997 Davis et al., 2013). Macroscopicamente as lesões, quando presentes, são adelgaçamento da parede do intestino

delgado com palidez e atrofia do pâncreas (Davis et al., 2013) e intestino delgado e ceco preenchidos por líquido (Goodwin et al., 1993).

As lesões histológicas são atrofia das vilosidades do duodeno e jejuno com ocasionais dilatações das criptas e degeneração vacuolar do pâncreas com necrose e atrofia das células acinares (Davis et al., 2013). Em outros casos pode haver atrofia das vilosidades com hiperplasia dos enterócitos das criptas e infiltrado por macrófagos, linfócitos e heterófilos na lâmina própria (Goodwin et al., 1993). Experimentalmente, as lesões de dilatação das criptas do duodeno e jejuno com achatamento do epitélio e restos celulares e material eosinofílico e amorfo no interior das dilatações surgiram principalmente com 7 dias após a inoculação. Essas alterações raramente são observadas com 4 ou 14 dias após infecção. Infiltrado intersticial de linfócitos é observado nos rins e pâncreas (Montgomery et al., 1997). Além disso, foram relatadas necrose hepática com infiltrado de macrófagos, tenossinovite, miocardite, pericardite e atrofia da bolsa cloacal (Tang e Fletcher, 1987).

Esse vírus está distribuído mundialmente (Rosenberger, 2003) e tem sido encontrado em aves sadias ou doentes (Goodwin et al., 1993). O ARV pode estar associado com outros agentes infecciosos como o *Cryptosporidium baileyi*, produzindo lesão sistêmica (Guy et al., 1988), ou potencializando as infecções por coccídios (Ruff e Rosenberger, 1985).

Vírus da bronquite infecciosa das galinhas (Coronavírus)

O vírus da bronquite infecciosa das galinhas (IBV) é um coronavírus aviário e acomete principalmente o sistema respiratório superior, mas também pode infectar os rins, oviduto e o sistema gastrointestinal (TGI) (Dhinaker Raj e Jones, 1997). O IBV pertence à família *Coronaviridae* e gênero *Gammacoronavirus*. É composto por uma fita simples de RNA, envelopado e mede 120 nm de diâmetro (Jackwood e De Wit, 2013). Esse vírus é composto por um envelope lipídico derivado de membranas celulares internas e quatro proteínas estruturais. Neste envelope encontram-se três proteínas estruturais, a proteína S, que constitui estruturas semelhantes a grandes espículas que ficam na superfície do envelope viral, a proteína M que é a mais abundante e se encontra por todo o envelope e a proteína E, que é mais escassa, porém necessária para brotamento do vírus com retículo endoplasmático formando o envelope lipídico. No interior do envelope há o genoma viral

que está envolvido pela proteína N (Figura 5) (Cavanagh et al., 2005).

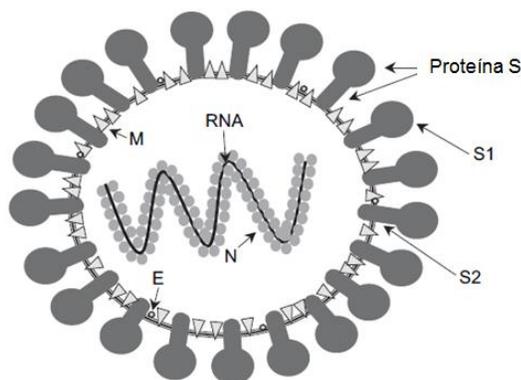


Figura 5. Desenho esquemático da estrutura do vírus da bronquite infecciosa (IBV) mostrando as proteínas estruturais S1 e S2, a M é mais abundante, a E é escassa e a N representando o RNA. (Fonte: Cavanagh et al., 2005, modificado).

As proteínas não estruturais são quatro, a 3a e 3b, codificadas pelo gene 3, e a 5a e 5b, codificadas pelo gene 5. Nenhuma dessas proteínas é necessária para a replicação viral quando realizado cultura celular, de traqueia ou de embriões de galinha (Casais et al., 2005; Hodgson et al., 2005). Portanto, as funções dessas proteínas ainda não são conhecidas.

O IBV está distribuído mundialmente e a transmissão é horizontal por meio de inalação ou por contato direto com outras aves ou fômites infectados. Não há ocorrência de transmissão vertical. O IBV pode ser encontrado na superfície da casca dos ovos, visto que o vírus pode estar presente no oviduto, ou ser excretado nas fezes por estar presente no TGI (Jackwood e De Wit, 2013). O vírus se liga e entra na célula hospedeira por meio da proteína S. A proteína S ao ser clivada origina a subunidade S1 e S2. A S1 é responsável pela ligação do vírus às células do hospedeiro e a S2 pela fusão do envelope com a superfície celular ou com a membrana endossomal, permitindo posteriormente a liberação do RNA no citoplasma para replicação viral (Casais et al., 2003). O local de ligação do S1 com o receptor ainda não é conhecido (Cavanagh et al., 2005). A replicação viral, portanto ocorre no interior do citoplasma sem a formação de corpúsculo de inclusão. Cinco RNA mensageiros são produzidos por um mecanismo descontínuo de transcrição. Três destes são responsáveis pela produção das proteínas virais S, M e N, enquanto os restantes são responsáveis pela produção das proteínas não estruturais, cuja função ainda não é conhecida, e da proteína E (Cavanagh et al., 2005). Partículas virais se acumulam no

interior de vesículas e são liberadas da célula infectada por lise ou por fusão da vesícula com a membrana celular (Wege et al., 1982; Cavanagh et al., 2005).

O IBV é capaz de infectar o sistema respiratório (cavidade nasal, traqueia, pulmões e sacos aéreos), rim, oviduto, testículos, bolsa cloacal e muitas partes do sistema digestório, como esôfago, pró-ventrículo, duodeno, jejuno, tonsilas cecais, reto e cloaca (Dhinaker Raj e Jones, 1997). Ainda não se sabe qual a variação existente entre os vírus ou hospedeiros para o órgão alvo ser diferente. Sabe-se que proteína S é um fator importante na determinação do tropismo celular (Kuo et al., 2000; Schwegmann-Wessels e Herrler, 2006). Estudos demonstraram o papel do ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) no processo de ligação do vírus com a superfície celular, revelando que o ácido siálico está relacionado com a capacidade de ligação do vírus (Schultze et al., 1992; Winter et al., 2006). Porém, o ácido siálico está presente em células que não são infectadas, portanto, acredita-se que haja um receptor secundário. Além disso, ainda há proteínas não estruturais cuja função ainda não é conhecida (Cavanagh, 2007). Outro fator que poderia ser considerado para compreensão do tropismo celular e susceptibilidade do IBV é a diferença genética entre os frangos (Bacon et al., 2004).

Em caso de infecção crônica, o IBV pode estar presente no TGI, como nas tonsilas cecais e na cloaca, causando uma doença entérica principalmente se tiver associado com outro fator (De Wit, 2000). Estudos têm encontrado esse vírus associado ou não a outros vírus ou agentes bacterianos (Montgomery et al., 1997; Pantin-Jackwood et al., 2008; Mettifogo et al., 2014; Hauck, 2016). Um estudo experimental com IBV revelou que esse vírus é capaz de se replicar em qualquer parte do intestino. Porém uma titulação mais baixa foi observada no pró-ventrículo, duodeno e jejuno quando comparado com o íleo, tonsila cecal, bolsa cloacal e reto (Ambali e Jones, 1990).

O período de incubação é de 2 a 4 dias (Chen et al., 2017). A idade de acometimento, os sinais clínicos e as lesões anatomopatológicas variam devido a capacidade do IBV de acometer órgãos distintos. Em um estudo, frangos de corte de 14 dias de idade apresentavam letargia, problemas de empenamento e desuniformidade do lote e macroscopicamente havia palidez da serosa do intestino delgado que estava distendido por grande quantidade de líquido aquoso. Em alguns casos, o ceco também estava distendido e com conteúdo espumoso, o pró-ventrículo aumentado com serosa pálida e os

rins pálidos. Histologicamente, havia aumento da celularidade da lâmina própria, discreta fusão das vilosidades e dilatação das criptas e infiltrado de linfócitos com áreas discretas de necrose no pró-ventrículo. Poucas aves tinham dilatação e mineralização nos rins e leve atrofia de pâncreas. AvRV e IBV foram detectados concomitantemente nessas aves. A imuno-histoquímica para IBV mostrou marcação do citoplasma dos enterócitos do topo das vilosidades do duodeno e jejuno, revelando predileção do vírus por enterócitos maduros. Além disso, havia marcação no reto/cloaca, pró-ventrículo e pâncreas. Posteriormente, esse mesmo estudo isolou o IBV, infectou aves SPF e estas apresentam somente sinais respiratórios, porém histologicamente havia as mesmas lesões no intestino delgado mencionadas anteriormente, como aumento da celularidade da lâmina própria, discreta fusão das vilosidades e dilatação das criptas (Hauck et al., 2016).

Outro estudo experimental com IBV mostrou que as aves apresentaram depressão com problemas de empenamento e sinais respiratórios como espirro, tosse e estertores. Na necropsia havia aumento e palidez dos rins com dilatação dos ureteres por deposição de urato. Alterações no TGI não foram observadas. As lesões histológicas do TGI foram somente no reto e eram caracterizadas por descamação celular do topo das vilosidades, congestão e infiltrado focal de linfócitos e macrófagos e ocasionalmente com heterófilos (Ambali e Jones, 1990).

Demais vírus detectados no conteúdo intestinal de aves de produção

Alguns vírus têm sido pesquisados recentemente e encontrados em aves comerciais com suspeita de RSS. Porém, esses vírus são encontrados concomitantemente a outros vírus e não há estudos experimentais, o que dificulta saber se existe atuação destes vírus como causa da RSS. Além disso, a maioria deles foi detectada somente por meio de estudos metagenômicos, como os vírus pertencentes às famílias *Picornaviridae* (Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), *Siphoviridae* e *Myoviridae* (Devaney et al., 2016), *Anelloviridae*, *Circoviridae* e CRESS-DNA vírus (Lima et al., 2019).

Referências bibliográficas

- AGBANDJE, M.; PARRISH, C.R.; ROSSMANN, M.G. The structure of parvoviruses. *Seminars in Virology*. v.6, p.299-309, 1995.
- AHMED, M.S.; AHMED, M.U. Detection of avian rotavirus-like virus in broiler chickens in Bangladesh. Bangladesh. *J Vet Med*. v. 4, p.73-77. 2006

- ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; Detection and propagation of avian enteric reovirus in chicken. *Arg Bras Med Vet Zoot.*, v.41, p. 497–501, 1989.
- AMBALI, A.G.; JONES, R.C. Early pathogenesis in chicks of infection with an enterotropic strain of infectious bronchitis virus. *Avian Dis.*, v.34, p.809–817, 1990.
- ARIAS, C. F.; ROMERO, P.; ALVAREZ, V.; LOPEZ, S. Trypsin activation pathway of rotavirus infectivity. *Journal of Virology*, v. 70, p. 5832-5839, 1996.
- AWANDKAR, S.P.; MOREGAONKAR, S.D.; MANWAR, S.J.; KAMDI, B.P.; KULKARNI, M.B. Comparative investigations of infectious runting and stunting syndrome in vaccinated breeder chicks by inactivated reovirus and chicks from non-vaccinated breeders, *IJVR (Iranian Journal of Veterinary Research)*, v. 18, n. 1, p. 6-12, 2017.
- BACON, L. D.; HUNTER, D. B.; ZHANG, H. M.; BRAND, K. ETCHES, R. Retrospective evidence that the MHC (B haplotype) of chickens influences genetic resistance to attenuated infectious bronchitis vaccine strains in chickens. *Avian Pathol.* v.33, p.605–609. 2004.
- BÁNYAI, K., DANDÁR, E., DORSEY, K.M., MATÓ, T., PALYA, V. The genomic constellation of a novel avian orthoreovirus strain associated with runting-stunting syndrome in broilers. *Virus Genes*, v. 42, n. 1, p. 82–89, 2010.
- BARNES, G.L.; GUY, J.S.; VAILLANCOURT, J.P. Poult enteritis complex. *Rev Sci Tech.*, v.19, p.565–588, 2000.
- BARNES, H.J.; GUY J.S. Poult enteritis-mortality syndrome. In: Diseases of poultry, 11th ed. Y. M. Saif, ed. Blackwell Publishing, Ames, IA. pp. 1171–1180. 2003.
- BATTILANI, M.; MURGIA, M.V.; LAVAZZA, A.; CECCHINATO, M.; CATELLI, E. Molecular characterization of rotavirus found during outbreaks of transmissible enteritis in grey partridge (*Perdix perdix*): preliminary results. *Large Anim. Rev.* v. 9, p. 111–112, 2003.
- BAXENDALE, W.; MEBATSION, T. The isolation and characterization of astroviruses from chickens. *Avian Pathol.* v. 33 p.364–370. 2004.
- BENAVENTE, J., MARTÍNEZ-COSTAS, J. Avian reovirus: Structure and biology. *Virus Res.*, v. 123, n. 2, p. 105–119, 2007.
- BERNS, K. I.; PARRISH, C. R. Parvoviridae. In: KNIPE, D. M. HOWLEY PM, Editors. Fields – *Virology*, 6th Ed., v. 2, p. 1768-1791, 2013.
- BIDIN, M.; LOJKIC, I.; BIDIN, Z.; TILJAR, M.; MAJNARIĆ, D. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia. *Avian Dis.*, v.55, p.693–696, 2011.
- BODELON, G., LABRADA, L., MARTÍNEZ-COSTAS, J., BENAVENTE, J. Modification of late membrane permeability in avian reovirus-infected cells. Viroporin activity of the S1-encoded nonstructural p10 protein. *J. Biol. Chem.* v.277, p.17789–17796, 2002.
- BOISVERT, M. FERNANDES, S.; TIJSSEN, P. Multiple pathways involved in porcine parvovirus cellular entry and trafficking toward the nucleus. *Journal of Virology*, v. 84, n. 15, p. 7782-7792, 2010.
- BORGAN, M.A.; MORI, Y.; ITO, N.; SUGIYAMA, M.; MINAMOTO, N. Antigenic analysis of nonstructural protein (NSP) 4 of group a avian rotavirus strain PO-13. *Microbiol Immunol.* v. 47, p.661-668, 2003.
- CANELLI E.; CORDIOLI, C.P.; BARBIERI, I.; CATELLA, A.; PENNELLI, D.; CERUTI, R.; MORENO, A.; LAVAZZA, A.. Astroviruses as causative agents of poultry enteritis: genetic characterization and longitudinal studies on field conditions. *Avian Dis.*, v.56, p.173–182, 2012.
- CASAI R., DOVE B., CAVANAGH D., BRITTON P. Recombinant avian infectious bronchitis virus expressing a heterologous spike gene demonstrates that the spike protein is a determinant of cell tropism, *J. Virol.* v.77, p.9084–9089, 2003.
- CASAI, R.; DAVIES, M.; CAVANAGH, D.; BRITTON, P. Gene 5 of the avian coronavirus infectious bronchitis virus is not essential for replication. *Journal of Virology*, v.79, p.8065-8078, 2005.
- CAVANAGH, D. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, v.34, n.6, p.439- 448, 2005.
- CAVANAGH, D. Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Vet Res.* v. 38, n. 2, p. 281-97, 2007.
- CHACKO, A.R., ARIFULLAH, M., SASTRI, N.P.; JEYAKANTHAN, J.; UENO, G.; SEKAR, K.; READ, R.J.; DODSON, E.J.; RAO, D.C.; SUGUNA, K. Novel Pentameric Structure of the Diarrhea-Inducing Region of the Rotavirus Enterotoxigenic Protein NSP4. *Journal of Virology*, v.85, n.23, p.12721–12732, 2011.
- CHARPILLENNE, A.; LEPAULT, J.; REY, F.; COHEN, J. Identification of rotavirus VP6 residues located at the interface with VP2 that are essential for capsid assembly and transcriptase activity. *Journal of Virology*, v. 76, p. 7822-7831, 2002.
- CHEN, Y.; JIANG, L.; ZHAO, W.; LIU, L.; ZHAO, Y.; SHAO, Y.; LI, H.; HAN Z.; LIU, S. Identification and molecular characterization of a novel serotype infectious bronchitis virus (GI-28) in China. *Veterinary Microbiology*, v. 198, p. 108–115, 2017.
- CONNOR, T.J.; MCNEILLY, F.; MCFERRAN, J.B.; MCNULTY, M.S. A survey of avian sera from Northern Ireland for antibody to avian nephritis virus. *Avian Pathol*, v. 16, p.15–20, 1987.
- DAVIS, J. F.; KULKARNI, A.; FLETCHER, O. Reovirus Infections in Young Broiler Chickens. *Avian Diseases*, v. 57, p.321–325, 2013.

DAY, M.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. A Multiplex RT-PCR Test for the Differential Identification of Turkey Astrovirus Type 1, Turkey Astrovirus Type 2, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus, and Avian Rotavirus. *Avian Diseases*, p. 51, n. 3, p. 681-684, 2007

DAY, J.M.; ZSAK, L. Determination and analysis of the full-length chicken parvovirus genome. *Virology*, v.399, p.59-64, 2010.

DAY, J.M.; ZSAK, L. Recent Progress in the Characterization of Avian Enteric Viruses. *Avian Diseases*, v. 57, p.573-580, 2013.

DE LA TORRE, D.I.; NUÑEZ, L.F.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P. Enteric Virus Diversity Examined by Molecular Methods in Brazilian Poultry Flocks. *Vet. Sci.*, v. 5, n. 2, 38, 2018.

DE WIT, J. J. Detection of infectious bronchitis virus. *Avian Pathology*, p. 29, n. 2, p. 71 - 93, 2000.

DE WIT, J.J.; DAM, G.B.; DE LAAR, J.M.; BIERMANN, Y.; VERSTEGEN, I.; EDENS, F.; SCHRIER, C.C. Detection and characterization of a new astrovirus in chicken and turkeys with enteric and locomotion disorders. *Avian Pathol.*, v.40, p.453-461, 2011.

DECAESSTECKER, M.; CHARLIER, G.; MEULEMANS, G. Significance of parvoviruses, entero-like viruses and reoviruses in the aetiology of chicken malabsorption syndrome. *Avian Pathol.*, v.15, p.769-782, 1986.

DEVANEY, R.; TRUDGETT, J.; TRUDGETT, A.; MEHARG, C.; SMYTH, V. A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathol.*, v.45, p.616-629, 2016.

DHINAKER RAJ, G.; JONES, R.C. Infectious bronchitis virus: Immunopathogenesis of infection in the chicken. *Avian Pathol.*, v.26, p.677-706, 1997.

DIDSBURY, A., WANG, C., VERDON, D., SEWELL, M.A., MCINTOSH, J.D., TAYLOR, J.A. Rotavirus NSP4 is secreted from infected cells as an oligomeric lipoprotein and binds to glycosaminoglycans on the surface of non-infected cells. *Virology Journal*, v. 8, p. 551, 2011.

DOMANSKA-BLICHARZ, K., SEROKA, A. MINTA, Z. Oneyear molecular survey of astrovirus infection in turkeys in Poland. *Arch Virol.*, v.156, p.1065-1072, 2011.

DUNCAN, R., The lowpH-dependent entry of avian reovirus is accompanied by two specific cleavages of the major outer capsid protein μ 2C. *Virology*, v.219, p.179-189, 1996.

ELLIS, M.N., EIDSON, C.S., FLETCHER, O.J. AND KLEVEN, S.H. Viral tissue tropisms and interferon production in White Leghorn chickens infected with two avian reovirus strains. *Avian Diseases*, v.27, p.644-651, 1983.

ESPINOZA, L.; BESERRA, L.A.; SOARES, R.M.; GREGORI, F.; ESPINOZA, L.L.; BESERRA, A.L.; GREGORI, F. Turkey astrovirus type 1 (TAsTV-1) and chicken astrovirus (CAstV) detection in Brazilian chicken flocks. *Avian Dis*, v. 60, p. 681-687, 2016.

ESTES, M.K., COHEN, J. Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, v. 53, n. 4, p. 410-449, 1989.

ESTES, M.; KAPIKIAN, A. Rotaviruses. In: KNIPE D.M., HOWLEY P.M., GRIFFIN D.E., LAMB R.A., MARTIN M.A., ROIZMAN B., STRAUS S.E. (eds) *Fields virology*, 5th edn. Kluwer Health/Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, p. 1917-1974, 2007.

FENG, B.; XIE, Z.; DENG, X.; XIE, L.; XIE, Z.; HUANG, L.; FAN, Q.; LUO, S.; HUANG, J.; ZHANG, Y.; ZENG, T.; WANG, S.; WANG, L. Genetic and phylogenetic analysis of a novel parvovirus isolated from chickens in Guangxi, China. *Archives of Virology*, v. 161, p. 3285-3289, 2016.

FOUNTAIN, J.; BRASH, M.; ZSAK, L.; NAGY, É. Detection of chicken parvovirus in broilers and broiler breeders in Ontario. 10th CAHLN meeting in Guelph, Canada. 2011.

FRAZIER, J.A.H.K; REECE, R.L.; KIDD, A.W.; CAVANAGH, D. Isolation of noncytopathic viruses implicated in the aetiology of nephritis and baby chick nephropathy and serologically related to Avian nephritis virus. *Avian Pathol*, v. 19, p.139-160, 1990.

GIBBONS, T.F., STOREY, S.M., WILLIAMS, C.V.; MCINTOSH, A.; MITCHEL, D.M.; PARR, R.D.; SCHROEDER, M.E.; SCHROEDER, F.; BALL, J.M. Rotavirus NSP4: Cell type-dependent transport kinetics to the exofacial plasma membrane and release from intact infected cells. *Virology Journal*, v. 8, p. 278, 2011.

GOODWIN, M.A.; DAVIS, J.F.; PLAYER, E.C. Reovirus associated enteritis in Georgia broiler chicks. *Avian Dis.*, v.37, p.229-233, 1993.

GRANDE, A., RODRIGUEZ, E., COSTAS, C., EVERITT, E., BENAVENTE, J. Oligomerization and cell-binding properties of the avian reovirus cell-attachment protein sigmaC. *Virology* v.274, p.367-377, 2000.

GUY, J.S., LEVY, M.G.; LEY, D.H.; BARNES, H.J.; GERIG, TM. Interaction of reovirus and *Cryptosporidium baileyi* in experimentally infected chickens. *Avian Dis.*, v.32, p.381-390, 1988.

GUY, J.S. Virus infections of the gastrointestinal tract of poultry. *Poultry Science*, v.77, n.8, p.1166-1175, 1998.

HAUCK, R.; GALLARDO, R.A.; WOOLCOCK, P.R. A Coronavirus associated with Runting Stunting Syndrome in Broiler Chickens. *Avian Dis.*, v.60, p.528-534, 2016.

HEMIDA, M.G. Detection and molecular characterization of group D avian rota virus in Kafrelsheikh and Gharbia Governorates. *J. Vet. Sci*, v. 39, p. 145-154. 2013.

HEWSON, K.A.; O'ROURKE, D.; NOORMOHAMMADI, A. H. Detection of Avian Nephritis Virus in Australian Chicken Flocks. *Avian Diseases*, v. 54, n. 3, p.990-993, 2010.

HODGSON, T., BRITTON, P.; CAVANAGH, D. Neither the RNA nor the proteins of open reading frames 3a and 3b of Infectious bronchitis virus are essential for replication. *Journal of Virology*, in press, 2005.

HYSER, J.M., COLLINSON-PAUTZ, M.R., UTAMA, B., ESTES, M.K. Rotavirus Disrupts Calcium Homeostasis by NSP4 Viroprotein Activity. *MBio*, v. 1, n. 5, 2010.

IMADA, T.; YAMAGUCHI, S.; MIURA, N.; KAWAMURA, H. Antibody survey against avian nephritis virus among chickens in Japan. *Natl Inst Anim Health Q (Tokyo)*, v. 20, p.79–80, 1980.

IMADA T, YAMAGUCHI S, MASE M, TSUKAMOTO K, KUBO M, MOROOKA A. Avian nephritis virus (ANV) as a new member of the family Astroviridae and construction of infectious ANV cDNA. *J Virol*. v. 74, p.8487–8493. 2000.

JACKWOOD M.W.; DE WIT, S. Infectious Bronchitis. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDOUGALD L.R. *et al.* (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.139–160.

JIANG, B.; MONROE, S.; KOONIN, E.V.; STINE, S.E.; GLASS, R.I. RNA sequence of astrovirus: Distinctive genomic organization and a putative retrovirus-like ribosomal frameshifting signal that directs the viral replicase synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.90, p.10539–10543, 1993.

JIANG, X.; CRAWFORD, S.E.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.V. Rotavirus structure. In: PATTON, J.T. (ed). *Segmented Double-Stranded RNA Viruses: Structure and Molecular Biology*. Caister Academic Press, Norfolk, UK, 2008, p.45–60.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D.P.; ZIEGLER, A.F.; LAGO, A.; GOYAL, S.M. A retrospective study on poult enteritis syndrome in Minnesota. *Avian Dis.*, v.53, p.268–75, 2009.

JINDAL, N.; PATNAYAK, D.P.; CHANDER, Y.; ZIEGLER, A.F.; GOYAL, S.M. Comparison of capsid gene sequences of turkey astrovirus-2 from poult-enteritis-syndrome-affected and apparently healthy turkeys. *Arch Virol.*, v.156, p.969–977, 2011.

JONES, R.C. Reovirus infections. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDOUGALD L.R. *et al.* (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.351–373.

KANG, K.I.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S.; DOREA, F.; WILLIAMS, S.M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. *Avian Pathol.*, v.41, p.41–50, 2012.

KANG, K.; LINNEMANN, E.; ICARD, A.H.; DURAIRAJ, V.; MUNDT, E.; SELLERS, H.S. Chicken astrovirus as an aetiological agent of runting-stunting syndrome in broiler chickens. *Journal of General Virology*. v. 99, p. 512–524, 2018.

KAPGATE, S.S.; KUMANAN, K.; VIJAYARANI K.; BARBUDDHE, S.B. Avian parvovirus: classification, phylogeny, pathogenesis and diagnosis. *Avian Pathol.* v. 24, p. 1–10, 2018..

KAPIKIAN, A. Z.; HOSHINO, Y.; CHANOCK, R. M. Rotaviruses. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M.; GRIFFIN, D. E.; LAMB, R. A.; MARTIN, M. A.; ROIZMAN, B.; STRAIS, S. E. *Fields virology*. 4. ed. Philadelphia: Lipincott William and Wilkins, p.1787-1833, 2001.

KATTOOR, J.J.; SHARMA, K.; KUMAR, N.; BATRA, M.; JINDAL, N.; YADAV, A.S.; MALIK, Y.S. Distribution frequency of avian rotaviruses in India, 2011-2013. *Adv Anim Vet Sci*. v. 1, p.148-150. 2013.

KING, A. M. Q.; ADAMS, M. J.; CARSTENS, E. B.; LEFKOWITZ, E. J. (Ed.). *Virus Taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. 9. ed. San Diego: Elsevier Academic Press, 1272 p. 2012.

KIRKWOOD, C.D., GENTSCH, J.R., GLASS, R.I. Sequence analysis of the NSP4 gene from human rotavirus strains isolated in the United States. *Virus Genes.*, v. 19, n. 2, p. 113-122, 1999.

KISARY, J. Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of broiler chickens. *Avian Pathol.*, v.14, p.269–273, 1985.

KOCI, M.D.; MOSER, L.A.; KELLEY, L.A.; LARSEN, D.; BROWN, C.C.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astrovirus induces diarrhea in the absence of inflammation and cell death. *J. Virol.*, v.77, p.11798–11808, 2003.

KOO, B.; LEE, H.; JEON, E.; JANG, H.; HAN, M.; MO, I. An unusual case of concomitant infection with chicken astrovirus and group A avian rotavirus in broilers with a history of severe clinical signs. *J. Vet. Sci.* n. 14, p. 231-233, 2013.

KOUWENHOVEN, B.; VERTOMMEN, M.H.; GOREN, E. Runting and stunting syndrome of broilers - the disease with many names and faces. *International Union of Immunological Societies Proceedings no. 66, Disease Prevention and Control in Poultry Production*, Sydney, pp. 73-96. 1983.

KUO L., GODEKE G.J., RAAMSMAN M.J., MASTERS P.S., ROTTIER P.J., Retargeting of coronavirus by substitution of the spike glycoprotein ectodomain: crossing the host cell species barrier, *J. Virol.* v.74, p.1393–1406, 2000.

LABRADA, L., BODELON, G., VINUELA, J., BENAVENTE, J., Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating but not viral gene expression is required for apoptosis induction. *J. Virol.* v.76, p.7932–7941, 2002.

LIMA, D.A.; CIBULSKI, S.P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A.P.M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T.F.; LOIKO, M.R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA¹ D.M.; MAYER, F.Q.; ROEHE, P.M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. *Virus Research*, v. 261, p. 9–20, 2019.

LONG, K.E.; OUCKAMA, R.M.; WEISZ, A.; BRASH, M.L.; OJKIĆ, D. White Chick Syndrome Associated with Chicken Astrovirus in Ontario, Canada. *Avian Diseases*, v. 62, p. 247–258, 2018.

LUBLIN, A.; MECHANI, S.; BUMBAROV, V. Involvement of rotavirus in intestinal infections of poultry and pet birds. Abstract presented at the 28th annual Israel veterinary symposium in memory of Dr. Ora Egozi, 2004. *Isr J Vet Med.* 59:3. 2004.

MAJUMDER, S.; CHAUHAN, T.K.S.; NANDI, S.; GOSWAMI, P.P.; TIWARI, A.K.; DHAMA, K.; MISHRA, B.P.; KUMAR, D. Development of a recombinant σ B protein based dot-ELISA for the diagnosis of avian reovirus (ARV). *v. 257, p. 69-72, 2018.*

MANDOKI M.; BAKONYI T.; IVANICS, E.; NEMES, C.; DOBOS-KOVACS, M.; RUSVAI, M. Phylogenetic diversity of avian nephritis virus in Hungarian chicken flocks. *Avian Pathol.* v. 35, p. 224–229. 2006.

MARGUERIE, J.; LEON, O.; ALBARIC, O.; GUY JS, GUERIN JL. Bimavirus-associated proventriculitis in French broiler chickens. *Vet. Rec.* v.169, p.394–396, 2011.

MARTÍNEZ-COSTAS, J.; VARELA, R.; BENAVENTE, J. Endogenous enzymatic activities of the avian reovirus S1133: identification of the viral capping enzyme. *Virology* n.206, p.1017–1026, 1995.

MASCARENHAS, J. D. P.; LINHARES, A. C.; GABBAY, Y.B.; LIMA, C.S.; GUERRA, S.F.; SOARES, L.S.; OLIVEIRA, D.S.; LIMA, J.C.; MACÊDO, O.; LEITE, J.P. Molecular characterization of VP4 and NSP4 genes from rotavirus strains infecting neonates and young children in Belém, Brazil. *Virus Research*, v. 126, n. 1-2, p. 149-158, 2007.

MATTHIJNSSENS, J.; CIARLET, M.; RAHMAN, M.; ATTOUI, H.; BÁNYAI, K.; ESTES, M.K.; GENTSCH, J.R.; ITURRIZA-GÓMARA, M.; KIRKWOOD, C.D.; MARTELLA, V.; MERTENS, P.P.; NAKAGOMI, O.; PATTON, J.T.; RUGGERI, F.M.; SAIF, L.J.; SANTOS, N.; STEYER, A.; TANIGUCHI, K.; DESSELBERGER, U.; VAN RANST, M. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Archives of Virology*, v. 153, p. 1621-1629, 2008.

MATTION, N.; COHEN, J.; ESTES, M. The rotavirus proteins. In KAPIKIAN, A. Z. (Ed.) *Viral infectious of gastrointestinal tract*. New York: Marcel Dekker., p. 169-249, 1994.

MCNEILLY, F.; CONNOR, T.J.; CALVERT, V.M.; SMYTH, J.A.; CURRAN, W.L.; MORLEY, A.J.; THOMPSON, D.; SINGH, S.; MCFERRAN, J.B.; ADAIR, B.M.; MCNULTY, M.S. Studies on a new enterovirus-like virus isolated from chickens. *Avian Pathol.* v.23, p.313–327, 1994.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; STUART, J.C. Rotavirus infection in avian species. *Vet. Rec.* v. 103, p. 319–320. 1978.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. *Avian Pathol.*, v.12, p.45–54, 1983.

MCNULTY, M.S.; CONNOR, T.J.; MCNEILLY, F. A survey of specific pathogen-free chicken flocks for antibodies to chicken anemia agent, avian nephritis virus and group A rotavirus. *Avian Pathol* 18:215–220. 1989.

MENENDEZ, N.A., CALNEK, B.W. AND COWEN, B.S. Localization of avian reovirus (FDO isolant) in tissues of mature chickens. *Avian Diseases*, v.19, p.112-117, 1975.

METTIFOGO E.; NUÑEZ, L.F.N.; CHACÓN, J.L.; SILVANA H. SANTANDER PARRA, S.H.S; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; JEREZ, J.A.; JONES, R.C.; FERREIRA, A.J.P..Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. *Scient. World J.*, v.2014, ID.450423, 2014.

MEULEMANS, G.; PEETERS, J E.; HALEN, P. Experimental infection of broiler chickens with rotavirus. *Br. Vet. J.* v. 141, p.69–73. 1985.

MONCEYRON, C.; GRINDE, B.; JONASSEN, T.Ø. Molecular characterisation of the 3'-end of the astrovirus genome. *Arch. Virol.* v.142, p.699–706, 1997.

MONTGOMERY, R.D.; BOYLE, C. R.; MASLIN, W. R.; MAGEE, D.L. Attempts to reproduce a runting/stunting type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis.* v. 41, p.80–92, 1997.

MOR, S.K.; ABIN, M.; COSTA, G. DURRANI, A.; JINDAL, N.; GOYAL, S.M.; PATNAYAK, D.P. The role of type-2 turkey astrovirus in poult enteritis syndrome. *Poult Sci.*, n.90, p.2747–2752, 2011.

MORAES, M. P.; COSTA, P. R. S. Parvoviridae. In: FLORES, E. F. *Virologia Veterinária*, Ed UFSM, Santa Maria, p. 441–480, 2012.

MORI, Y., BORGAN, M.A., ITO, N., SUGIYAMA, M., MINAMOTO, N. Sequential analysis of nonstructural protein NSP4 derived from group A avian rotaviruses. *Vir. Res.*, v. 89, n. 1, p. 145-151, 2002.

MUNDT, E.; COLLETT S.R.; BERGHAUS, R.; PEDROSO, A.A.; LEE, M.D.; MAURER, J.J. Can Bacteriotherapy Using Commercially Available Probiotics, Prebiotics, and Organic Acids Ameliorate the Symptoms Associated with Runting-Stunting Syndrome in Broiler Chickens? *Avian Dis.*, v. 59, n. 2, p. 201-206, 2015.

MUZYCZKA, M.; BERNIS, K.I. Parvoviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (eds). *Fields Virology*. 4. ed. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, Cap. 69, p. 2327-2359, 2001.

NIBERT, M.L., SCHIFF, L.A. Reoviruses and their replication. In: Knipe, D.M., Hooley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, fourth ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 1679–1728, , 2001.

NICHOLAS, R.A.J.; GODDARD, R.D.; LUFF, P.R. Prevalence of avian nephritis virus in England. *Vet Rec.* v. 123, p. 398. 1988.

NIGHT, P.K.; MOESER, A.; ALI, R.A.; BLIKSLAGER, A.T.; KOCI, M.D. Astrovirus infection induces sodium malabsorption and redistributes sodium hydrogen exchanger expression. *Virology*, v.401, p.146–154, 2010.

- NOIVA, R.; GUY, J.S.; HAUCK, R.; SHIVAPRASAD, H.L. Runting stunting syndrome associated with transmissible viral proventriculitis in broiler chickens. *Avian Dis.*, v.59, p.384–387, 2015.
- NUÑEZ, L.F.; PARRA, S.H.; METTIFOGO, E.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; PIANTINO FERREIRA, A.J. Isolation and molecular characterization of chicken parvovirus from Brazilian flocks with enteric disorders. *British Poultry Science*, v. 56, p. 39–47. 2015.
- NUÑEZ, L.F.; SÁ, L.R.; PARRA, S.H.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; CARRANZA, C.; FERREIRA, A.J. Molecular detection of chicken parvovirus in broilers with enteric disorders presenting curving of duodenal loop, pancreatic atrophy, and mesenteritis. *Poult Sci.* v. 95, p. 802-10. 2016.
- OLSEN, D.E. Isolation of a reovirus-like agent from broiler chicks with diarrhoea and stunting. *Proceedings of the 26th Western Poultry Disease Conference*, Davis California, p. 131-139, 1977.
- OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). *Avian Dis.*, v.50, p.411– 418, 2006.
- OTTO, P.H.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet Microbiol.*, v.156, p.8–15, 2012.
- PAGE, R.K.; FLETCHER, O.J.; ROWLAND, G.N.; GAUDRY, D.; VILLEGAS, P. Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian Diseases*, v.26, n.3, p.618–624, 1982.
- PAGER, C.T., ALEXANDER, J.J., STEELE, A.D. South African G4P[6] asymptomatic and symptomatic neonatal rotavirus strains differ in their NSP4, VP8*, and VP7 genes. *J. Med. Virol.*, v. 62, n. 2, p. 208-216, 2000.
- PALADE, E.A.; KISARY, J.; BENYEDA, Z.; MÁNDOKI, M.; BALKA, G.; JAKAB, C.; VÉGH, B.; DEMETER, Z.; RUSVAI, M.. Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian Pathol.*, v.40, p.191–197, 2011.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; WOOLCOCK, P.R. Molecular characterization and typing of chicken and turkey astroviruses circulating in the United States: implications for diagnostics. *Avian Dis.*, v.50, p.397–404, 2006.
- PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Dis.*, v.51, p.674–680, 2007.
- PANTIN-JACKWOOD, M., DAY, J.M.; JACKWOOD, M.W.; SPACKMAN, E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.*, v.52, p.235–244, 2008.
- PATTON, J. T.; VASQUEZ-DEL CARPIO, R.; TORTORICI, M. A.; TARAPOREWALA, Z. F. Coupling of rotavirus genome replication and capsid assembly. *Advances in Virus Research*, v. 69, p. 167–201, 2007.
- PESAVENTO, J.B.; CRAWFORD, S.E.; ESTES, M.K.; PRASAD, B.V.V. Rotavirus proteins: Structure and assembly. *Curr Top Microbiol Immunol.*, v.309, p.189–219, 2006.
- QAMAR, M.F.; ASLAM, H.; JAHAN, N. Histopathological Studies on Stunting Syndrome in Broilers, Lahore, Pakistan. *Vet Med Int.* 2013:212830. 2013
- RAINSFORD, E. W.; MCCRAE, M. A. Characterization of the NSP6 protein product of rotavirus gene 11. *Virus Research*, v. 130, p. 193-201, 2007.
- REBEL, J.M.; BALK, F.R.; POST, J.; VAN HEMERT, S.; ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE, N. Malabsorption syndrome in broilers. *Worlds Poult. Sci. J.*, v.62, p.17–29, 2006.
- REYNOLDS, D.L.; SAIF, Y.M.; THEIL, K.W. A survey of enteric viruses of turkey poults. *Avian Dis.*, v.31, p.89–98, 1987.
- REYNOLDS, D.L.; SCHULTZ-CHERRY, S. Astroviruses. In: SAIF, Y.M.; FADLY, A.M. GLISSON, J.R. (Eds). *Diseases of Poultry*, 12 ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, 2008, p.351-355.
- ROBERTSON, E.I.; ANGSTROM, C.I.; CLARK, H.C.; SMITH, M. Field research on stunted chick disease. *Poultry Science*, v. 28, p. 14-18, 1949
- ROBERTSON, M.D.; WILCOX, G.E.; KIBENGE, F.S.B. Prevalence of reoviruses in commercial chickens. *Aus Vet J.*, v.61, p.319–322, 1984.
- ROBERTSON, M.D., WILCOX, G.E. Avian reovirus. *Vet. Bull.* v.56, p.759–766, 1986.
- ROSENBERGER, J.K. Reovirus infections. In: SAIF, Y.M.; BARNES, H.J.; GLISSON, J.R.; FADLY, A. M.; MCDUGALD, L. R.; SWAYNE, D. E. (Eds). *Diseases of Poultry*, 11 ed. Iowa State Press, Ames, Iowa, 2003, p. 283–293.
- ROUSSAN, D.A.; SHAHEEN, I.A.; KHAWALDEH, G.Y.; TOTANJI, W.S.; AL-RIFAI, R.H. Simultaneous detection of astrovirus, rotavirus, reovirus and adenovirus type 1 in broiler chicken flocks. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.15, p.337–344, 2012.
- RUFF, M.D.; ROSENBERGER, J.K. Concurrent infections with reoviruses and coccidia in broilers. *Avian Dis.*, v.29, p.465–478, 1985.
- SAIF, Y.M. Viral enteric infections. In: SWAYNE D.E.; GLISSON J.R.; MCDUGALD L.R.; NOLAN, L.K.; SWAYNE, D.E. (Eds). *Diseases of Poultry*. 13 ed. UK: Wiley-Blackwell, 2013, p.375–376.
- SAIKAWA, T.; ANDERSON, M.; MOMOEDA, M.; KAJIGAYA, S.; YOUNG, N.S. Neutralizing linear epitopes of B19 parvovirus cluster in the VP1 unique and VP1–VP2 junction regions. *J. Virol.* 67, 3004–3009, 1993.

SCHULTZE B.; CAVANAGH D.; HERRLER G. Neuraminidase treatment of avian infectious bronchitis coronavirus reveals a hemagglutinating activity that is dependent on sialic acid-containing receptors on erythrocytes, *Virology*. v.189, p.792–794, 1992.

SCHWEGMANN-WESSELS, C. HERRLER, G. Sialic acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycoconj. J.* 23:51–58. 2006.

SELLERS, H.S.; ZAVALA, G.; MUNDT, E. Experimental reproduction of runting and stunting syndrome in broilers. *Poult. Sci., E-suppl.*1, p.179–180, 2009.

SELLERS, H.; LINNEMAN, E.; ICARD, A.H.; MUNDT, E. A purified recombinant baculovirus expressed capsid protein of a new astrovirus provides partial protection to runting-stunting syndrome in chickens. *Vaccine*, n.28, p.1253–1263, 2010.

SHAPIRO F.; NIR, I.; HELLER, D. Stunting syndrome in broilers: effect of stunting syndrome inoculum obtained from stunting syndrome affected broilers, on broilers, leghorns and Turkey poults. *Poultry Science*, v.77, n.2, p.230–236, 1998.

SHMULEVITZ, M., YAMEEN, Z., DAWE, S., SHOU, J., O'HARA, D., HOLMES, I., DUNCAN, R. Sequential partially overlapping gene arrangement in the tricistronic S1 genome segments of avian reovirus and Nelson Bay reovirus: implications for translation initiation. *J. Virol.* 76, 609–618, 2002.

SMART, I.J.; BARR, D. A.; REECE, R. L.; FORSYTH, W.M.; EWING, I. Experimental reproduction of the runting-stunting syndrome of broiler chickens, *Avian Pathology*, v. 17, n. 3, p. 617–627, 1988.

SMYTH, J.A.; CONNOR, T.J.; MCNEILLY, F.; MOFFET, D.A.; CALVERT, V.M.; MCNULTY, M.S. Studies on the pathogenicity of enterovirus-like viruses in chickens. *Avian Pathol.* v.36, p.119–126, 2007.

SMYTH V.J. A Review of the Strain Diversity and Pathogenesis of Chicken Astrovirus. *Viruses*. v. 9, p. 29-38, 2017.

SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; PANTIN-JACKWOOD, M.J. Astrovirus, reovirus, and rotavirus concomitant infection causes decreased weight gain in broad-breasted white poults. *Avian Dis.*, v.54, p.16–21, 2010.

SPANDIDOS, D.A., GRAHAM, A.F. Physical and chemical characterization of an avian reovirus. *J. Virol.*, v. 19, n. 3, p. 968–976, 1976.

STUCKER, K.M.; STOCKWELL, T.B.; NYAGA, M.M.; HALPIN, R.A.; FEDOROVA, N.; AKOPOV, A.; NGOVENI, H.; PEENZE, I.; SEHERI, M.L.; MPHAHLELE, M.J.; WENTWORTH, D.E. Complete genomic sequence for an avian group g rotavirus from South Africa. *Genome Announc.* 3:e00107_e00115. 2015.

TANG, K.N.; FLETCHER, O.J. Application of the Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) Technique for Detecting Avian Reovirus in Chickens. *Avian Dis.*, v. 31, p. 591-96, 1987.

TANG, Y.; MURGIA, M.V.; WARD, L.; SAIF, Y.M. Pathogenicity of turkey astroviruses in turkey embryos and poults. *Avian Dis.*, v.50, p.526–531, 2006.

TARASIUK, K.; WOZNAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland. *Open Virol J.*, v.6, p.7–11, 2012.

TARAPOREWALA, Z. F.; PATTON, J. T. Identification and Characterization of the Helix-Destabilizing Activity of Rotavirus Nonstructural Protein NSP2. *Journal of Virology*, v. 75, n. 10, p. 4519-4527, 2001.

TATTERSALL, P. The evolution of parvovirus taxonomy. In: KERR, J.R.; COTMORE, S.F.; BLOOM, M.E. (Eds). *Parvoviruses*. Hodder Arnold, London, 2006, p.5–14.

TEIRLYNCK, E.; GUSSEM, M.; DEWULF, J.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Morphometric evaluation of 'dysbacteriosis' in broilers. *Avian Pathol*, v. 40, n. 2, p.139-144, 2011.

TER VEEN, C.; DE BRUIJN, N. D.; DIJKMAN, R.; DE WIT, J. J. Prevalence of histopathological intestinal lesions and enteric pathogens in Dutch commercial broilers with time. *Avian Pathology*, v. 46, p. 95 -105, 2017.

TOURIS-OTERO, F.; MARTÍNEZ-COSTAS, J.; VAKHARIA, V.N.; BENAVENTE, J. Avian reovirus nonstructural protein microNS forms viroplasm-like inclusions and recruits protein sigmaNS to these structures. *Virology*. n. 319, p. 1, p. 94-106, 2004.

VAN DER HEIDE, L.; KALBAC, M. Infectious tenosynovitis (viral arthritis): characterization of a Connecticut viral isolate as a reovirus and evidence of viral egg transmission by reovirus-infected broiler breeders. *Avian Dis.*, v.19, p.683–688, 1975.

VAN LOON, A.A.; KOOPMAN, H.C.; KOSMAN, W.; MUMCZUR, J.; SZELESZCZUK, O.; KARPINSKA, E.; KOSOWSKA, G.; LÜTTICKEN, D. Isolation of a new serotype of avian reovirus associated with malabsorption in chickens. *Vet Quart.*, v.23, p.129–133, 2001.

VARELA, R., BENAVENTE, J. Protein coding assignment of avian reovirus strain S1133. *J. Virol.* 68, 6775–6777, 1994.

VARELA, R., MARTÍNEZ-COSTAS, J., MALLO, M., BENAVENTE, J. Intracellular posttranslational modifications of S1133 avian reovirus proteins. *J. Virol.* 70, 2974–2981, 1996.

VASCONCELOS, S.B.S.; BOTTINO J.A.; GUERRA J.L.; JEREZ, J.A. Lesões articulares em frangos de corte (*Gallus gallus*) na infecção experimental pelo reovírus aviário. *Braz. Journal Veterinary Research Animal Science*, v. 38, n. 2, p. 80-83, 2001.

VÁZQUEZ-IGLESIAS, L., LOSTALÉ-SEIJO, I., MARTÍNEZ-COSTAS, J., BENAVENTE, J. Avian Reovirus SigmaA Localizes to the Nucleolus and Enters the Nucleus by a Nonclassical Energy- and Carrier-Independent Pathway. *Journal of Virology*, v, 83, n. 19, p. 10163–10175, 2009.

- WEGE, H.; SIDDEL, S.; TER MEULEN, V. The biology and pathogenesis of coronaviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* v.99, p.165–200, 1982.
- WINTER C.; SCHWEGMANN-WESSELS C.; CAVANAGH D.; NEUMAN U.; HERRLER G. Sialic acid is a receptor determinant for infection of cells by avian infectious bronchitis virus, *J. Gen. Virol.* v.87, p.1209–1216, 2006.
- WOLF, S.; REETZ, J.; OTTO, P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch. Virol.*, v.156, p.1143–1150, 2011.
- XU, W., PATRICK, M.K., HAZELTON, P.R., COOMBS, K.M. Avian reovirus temperature-sensitive mutant *tsA12* has a lesion in major core protein σ A and is defective in assembly. *J. Virol.*, v.78, n.20, p.11142–11151, 2004.
- YASON, C. V; SCHAT, K. A. Experimental infection of specific pathogen-free chickens with avian rotaviruses. *Avian Dis.* 30:551–556. 1986.
- YIN, H.S., SHIEN, J.H., LEE, L.H. Synthesis in *Escherichia coli* of avian reovirus core protein σ A and its dsRNA-binding activity. *Virology*, v. 266, n. 1, p. 33–41, 2000.
- ZAVALA, G.; SELLERS, H. Runting-stunting syndrome. *Poult Informed Professional.* V.85, p.1–10, 2005.
- ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; POST, J.; BALK, F.; VAN REENEN, C.; GRUYS, E.; REBEL, J.M. The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis. *Avian Pathol.*, v.34, p.402–407, 2005.
- ZHANG, M., ZENG, C.Q., DONG, Y., BALL, J.M., SAIF, L.J., MORRIS, A.P., ESTES, M.K. Mutations in rotavirus nonstructural glycoprotein NSP4 are associated with altered virus virulence. *J. Virol.*, v. 72, n. 5, p. 3666-3672, 1998.
- ZHANG, X., TANG, J., WALKER, S.B., O'HARA, D., NIBERT, M.L., DUNCAN, R., BAKER, T.S. Structure of avian *Orthoreovirus* virion by electron cryomicroscopy and image reconstruction. *Virology* v.343, p.25–35, 2005.
- ZSAK, L.; STROTHER, K.O.; KISARY, J.; Partial genome sequence analysis of parvoviruses associated with enteric disease in poultry. *Avian Pathol.* v.37, n.4, p.435–441, 2008.
- ZSAK, L.; DAY, J.M.; STROTHER, K.O. Enteric disease in broiler chickens following experimental infection with chicken parvovirus. In: Proceedings of the American Association of Avian Pathologists Annual Meeting, Seattle, WA, abstract 7598, 2009.
- ZSAK, L.; DAY, J.M. The pathogenicity of parvovirus in chickens. In: Proceedings of the American Association of Avian Pathologists Annual Meeting, Atlanta, GA, abstract 9293, 2010.
- ZSAK, L.; CHA, R.M.; DAY, J.M. Chicken parvovirus-induced runting-stunting syndrome in young broilers. *Avian Dis.*, v.57, p.123–127, 2013.

Estudo histopatológico associado a métodos moleculares e *in situ* em frangos de corte com a síndrome do definhamento e da refugagem

Letícia Batelli de Oliveira¹; James B. Stanton²; Jian Zhang²; Corrie Brown²; Salman Latif Butt²; Kiril Dimitrov^{3,4}; Claudio L. Afonso³; Jeremy D. Volkening⁵; Leonardo José Carmargos Lara⁶; Roselene Ecco¹

1. Setor de Patologia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
2. Departamento de Patologia, Colégio de Medicina Veterinária, University of Georgia, Athens, GA, 30602, Estados Unidos.
3. Southeast Poultry Research Laboratory, US National Poultry Research Center, Agricultural Research Service, USDA, 934 College Station Rd, Athens, GA, 30605, Estados Unidos.
4. Texas A&M Veterinary Medical Diagnostic Laboratory, 6610 Amarillo Blvd West, Amarillo, TX 79106, Estados Unidos.
5. Base2bio, Oshkosh, Wisconsin, Estados Unidos.
6. Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Abstract

Runting Stunting Syndrome (RSS) in commercial chicken has been reported worldwide and, although several studies have been carried out to clarify the etiology, there are some gaps in relation to the epidemiological, pathogenic and etiological aspects. In order to describe the intestinal lesions in the different segments and age, in addition to investigating the etiology, naturally infected chicks presenting growth retardation, apathy, poorly digested food in the feces or diarrhea were collected from commercial farms located in the state of Minas Gerais. Chicks without clinical signs were used as control. The average weight of affected chicks was 26% lower than expected for their flocks. Macroscopically, the small intestine of these chicks had paler serosa, with a watery, mucous or foamy content with poorly digested food. Histologically, there was mild to marked dilation of the crypt with flattening of the crypt epithelium and necrotic crypts. Jejunum was the segment more affected histologically. The histologic morphometry of the intestines revealed villous atrophy especially in jejunum and ileum. Histological changes in other organs were not observed. Next-generation sequencing (NGS) detected avian nephritis virus (ANV), avian rotavirus (AvRV) and picornavirus in jejunum from 7-day-old chicks. In the one-day-old chicks no viruses were detected in the jejunum. In Fisher's exact test, only the picornavirus was statistically significant ($p < 0.05$) comparing chicks with and without histological lesions. Sequence analysis of the picornavirus revealed genetic similarity with *Gallivirus* (GV) genus. In situ hybridization (ISH) for GV was performed and no association between virus and lesion was found.

Introdução

O Brasil é o segundo maior produtor e o maior exportador de frangos de corte (ABPA, 2019), e a produção de frangos do Brasil aumentará a cada ano devido ao aumento na exportação e no consumo nacional. Consequentemente, a posição do Brasil no mercado mundial tende a crescer (OECD/FAO (2019)).

A síndrome do definhamento e da refugagem (RSS, em inglês *Runting Stunting Syndrome*) é uma doença entérica que resulta em perdas econômicas severas devido à diminuição no ganho de peso, piora da conversão alimentar e desuniformidade do lote (Barnes et al., 2000). RSS tem sido relatada em muitos países, como por exemplo no Brasil (Mettifogo et al., 2014), Estados Unidos (Pantin-Jackwood et al., 2008; Zsak et al., 2009), na Holanda (Songserm et al., 2000), Alemanha (Otto et al., 2006), Hungria (Palade et al., 2011), Croácia (Bidin et al., 2011), Polônia (Tarasiuk et al., 2012), Irã (Nili et al., 2007), Jordânia (Roussan et al., 2012) e Paquistão (Qamar et al., 2013).

A RSS acomete principalmente galinhas jovens de até três semanas de idade (Rebel et al., 2006), mas geralmente ocorre nos primeiros sete dias de vida (Otto et al., 2006; Kang et al., 2012). Os principais sinais clínicos são diarreia com alimento mal digerido nas fezes, diminuição no ganho de peso com retardo no crescimento, desenvolvimento anormal das penas, e alta morbidade (Page et al., 1982; Kisary 1985; Zavala e Sellers, 2005). Na necropsia, o intestino delgado está pálido, com conteúdo aquoso, mucoso ou espumoso associado com alimento pouco digerido, e ainda pode estar distendido por gás (Rebel et al., 2006; Kang et al., 2012; Qamar et al., 2013; Zsak et al., 2013). Microscopicamente, há dilatação das criptas com achatamento do epitélio (enterite cística) (Kouwenhoven et al., 1983) e atrofia e fusão das vilosidades do intestino delgado (Zavala e Sellers, 2005; Otto et al., 2006; Kang et al., 2012; Qamar et al., 2013).

A etiologia exata da RSS não é bem compreendida. Muitos vírus têm sido descritos em associação com essa síndrome. Em alguns casos, acredita-se que a RSS é causada por uma associação de um ou mais vírus. Os principais vírus relatados são astrovírus das galinhas (CAstV) (Kang et al., 2012; Devaney et al., 2016; Kang et al., 2018), vírus da nefrite aviária (ANV) (Day et al., 2007; Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012; Devaney et al., 2016), parvovírus das galinhas (ChPV) (Palade et al., 2011; Zsak et al., 2013; Devaney et al., 2016; Kapgate et al., 2018), reovírus aviário (ARV) (Pantin-

Jackwood et al., 2008; Devaney et al., 2016), rotavírus aviário (AvRV) (Pantin-Jackwood et al., 2008; Otto et al., 2012) e vírus da bronquite infecciosa (IBV) (Devaney et al., 2016; Hauck et al., 2016). Recentemente, outros vírus tem sido detectados como possíveis agentes da enterite cística, como o birnavírus (Marguerie et al., 2011; Noiva et al., 2015; Lima et al., 2019), calicivírus (Wolf et al., 2011; Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), adenovírus aviário do grupo I (FAdV-I) (Roussan et al., 2012; Mettifogo et al., 2014; De la Torre et al., 2018; Lima et al., 2019) e outros vírus pertencentes às famílias *Picornaviridae* (Devaney et al., 2016; Lima et al., 2019), *Siphoviridae*, *Myoviridae* (Devaney et al., 2016), *Anelloviridae*, *Circoviridae* e vírus CRESS-DNA (Lima et al., 2019).

No Brasil, vírus causando a RSS tem sido recentemente descritos, demonstrando infecções por um ou mais vírus (Mettifogo et al., 2014; Finkler et al. 2016a; Finkler et al. 2016b; Mascarenhas et al., 2016; Nuñez et al., 2016; De la Torre et al., 2018; Nuñez et al., 2018; Lima et al., 2019). A maioria dos estudos mencionados pesquisaram vírus a partir de fezes, e não caracterizaram as lesões histológicas com os segmentos do intestino. Apenas um desses estudos realizou exame histopatológico, mas somente do duodeno e pâncreas (Nuñez et al., 2016). Apesar de que nenhum estudo foi realizado para detectar o antígeno ou ácido nucléico viral na lesão. Assim, deve-se também considerar a microbiota viral normal. O objetivo deste estudo foi descrever as lesões histológicas nos diferentes segmentos intestinais em pintinhos naturalmente infectados, conjuntamente com detecção viral no jejuno por sequenciamento de última geração (NGS, em inglês *next-generation sequencing*) e por hibridização *in situ* (ISH, em inglês *in situ hybridization*).

Material e métodos

Amostras

Duzentos e quarenta e três pintinhos foram coletados de quatro diferentes granjas e seis diferentes lotes e galpões no período de 2016 e 2017. As granjas comerciais localizavam-se em três municípios diferentes do estado de Minas Gerais (Pará de Minas, Nova Serrana e São Sebastião do Oeste). Os pintinhos eram fêmeas ou machos, havendo alguns galpões mistos, variando de um a onze dias de idade (Tabela 1). Pintinhos de um dia

foram coletados de incubatório antes de serem alojados nos galpões. Pintinhos de 4 e 5 dias não foram coletados.

Tabela 1: Granjas e galpões de cada lote com o número e idade de cada frango de corte coletado.

Granja X	Granja Y	Granja W	Granja Z
<u>Lote 1</u>	<u>Lote 2</u>	<u>Lote 4</u>	<u>Lote 6</u>
Galpão A	Galpão B e C	Galpão D	Galpão F
Idade: 3 dias	Idade: 7 e 11 dias	Idade: 8 dias	Idade: 6 dias
Núm. de aves: 30	# de aves: 30	# de aves: 18	# de aves: 30
	<u>Lote 3</u>	<u>Lote 5</u>	
	Incubatório e Galpão B	Galpão E	
	Idade: 1, 3 e 7 dias	Idade: 9 dias	
	# de aves: 30 de cada	# de aves: 15	

Os lotes selecionados tinham pintinhos com sinais clínicos característicos de RSS, como apatia, retardo no crescimento, diarreia e desenvolvimento anormal das penas. Pintinhos sem sinais clínicos foram coletados dos mesmos lotes como controle. Pintinhos (n = 100) de cada lote eram pesados aleatoriamente em balança de precisão digital modelo MF Filizola[®] para cálculo da média do peso do lote. No setor de Patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), cada pintinho foi pesado individualmente em mesma balança digital de precisão e eutanasiado pelo método de deslocamento cervical segundo as Diretrizes para eutanásia da Resolução 1000/2012 do CFMV. Os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as recomendações do Comitê Ético de Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (Protocolo 62/2017). Após a eutanásia, os pintinhos foram necropsiados para avaliação macroscópica. Amostras de duodeno, jejuno, íleo e demais órgãos foram coletadas e fixadas por 48h em formalina tamponada neutra a 10%. Cada segmento do intestino delgado foi seccionado e coletado em três regiões distintas.

Cálculo para o tamanho amostral

O tamanho da amostra foi calculado utilizando-se a prevalência esperada, com base em relatos de prevalência da doença em outros estudos. No presente trabalho, essa informação foi obtida a partir de um estudo de Mettifogo et al. (2014), onde a prevalência da doença foi de 80,7%. Utilizando o método estatístico para amostragem aleatória simples

foi realizado o cálculo do tamanho da amostra com base na prevalência, onde obteve-se tamanho amostral de 30 animais por coleta, ou seja, por galpão/lote.

Histopatologia

Os tecidos fixados foram embebidos em parafina para obtenção de cortes finos de 5 µm de espessura, que foram corados com hematoxilina e eosina (HE) segundo os procedimentos de rotina e finalmente analisados em microscopia de luz branca (Luna, 1968).

Todos os pintinhos de três a 11 dias de idade (n = 213) foram examinados histologicamente. Lâminas de cada segmento do intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) contendo aproximadamente sete secções foram analisadas e na secção que havia as alterações mais severas, as criptas foram contabilizadas e classificadas as células inflamatórias. O número de criptas normais, dilatadas e em necrose foi contado em 360° graus e as células inflamatórias foram classificadas segundo o tipo celular, a intensidade e a distribuição. As células inflamatórias identificadas foram heterófilos, macrófagos e linfócitos e plasmócitos. A intensidade foi determinada de acordo com a média estimada do número de células inflamatórias presentes em um campo de maior aumento (400x): discreto = 0 a 10 células, moderado = 11 a 20 células, e acentuado = mais de 21 células. A distribuição da inflamação foi classificada como focal, multifocal, multifocal a coalescente e difusa. Além disso, os demais órgãos destas aves também foram avaliados em relação à presença, tipo e distribuição da lesão histológica.

Morfometria

A análise morfométrica do intestino foi realizada do duodeno, jejuno e íleo de pintinhos de 7 dias de idade, seis com intestino normal e seis com lesões histológicas consistentes com RSS (total de 12 animais). Os índices morfométricos incluíram a altura das vilosidades (do topo da vilosidade à abertura da cripta) e a profundidade da cripta (da base das vilosidades à base da cripta) para avaliar a intensidade e a distribuição da atrofia das vilosidades. Vinte e cinco vilosidades e criptas foram contadas para cada animal utilizando o software *Leica Application Suite* (LAS) v4.2 Leica®. As variáveis altura das vilosidades e profundidade das criptas de cada segmento foram comparadas entre pintinhos

saudáveis e doentes. Para determinar a significância estatística, foi realizada a análise de variância considerando o erro tipo I de 5%.

Amostras para testes moleculares

Um subconjunto das amostras de jejuno usadas para histopatologia foram preparadas para testes moleculares no Departamento de Patologia Animal, na *University of Georgia* (UGA), Estados Unidos. Doze amostras com lesões histológicas acentuadas foram selecionadas e utilizadas como amostras de RSS, e treze amostras sem alterações histológicas foram selecionadas e usadas como controle. As amostras foram previamente coletadas de duas granjas sendo três lotes diferentes alojados em dois galpões distintos.

Extração de RNA

Para cada amostra, vinte cortes de 5 μm de espessura foram realizados e acondicionados em microtubo de 1,5 ml. O micrótomo e as navalhas eram descontaminados com álcool 70% e RNase (Sigma, USA) antes e depois da coleta dos tecidos seccionados de cada amostra para evitar contaminação cruzada entre as amostras. Posteriormente foram desparafinizados com CitriSolv™ (VWR International, USA), e o RNA total era extraído usando kit *RNeasy FFPE Kit* (Qiagen, USA) conforme recomendações do fabricante. O RNA foi quantificado usando o kit Qubit® *RNA HS Assay Kit* em fluorômetro 3.0 Qubit® (ThermoFisher Scientific, USA) e a purificação do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro NanoDrop® 2000/2000c (ThermoFisher Scientific, USA). O tamanho do fragmento de RNA foi mensurado usando o kit *RNA 6000 Pico Kit* em instrumento *Agilent Bioanalyzer*® (Agilent Technologies, USA) conforme recomendações do fabricante.

Preparação das bibliotecas do NGS

Foram preparadas bibliotecas de DNA com *Kapa Stranded RNA-seq Kit* para plataforma Illumina (Kapa Biosystems, USA) seguindo as recomendações do fabricante. A primeira e a segunda fita de DNA eram ligadas em primers aleatórios e, em seguida, os fragmentos de DNA complementar (cDNA) foram marcados por adaptadores contendo *barcode*, que são códigos que permitem identificar cada amostra, para assim ser possível executar um único sequenciamento com todas as amostras simultaneamente. As bibliotecas

ligadas aos adaptadores e purificadas por meio de *beads* foram amplificadas por PCR (reação em cadeia polimerase) (10 ciclos) utilizando o *Master Mix* para amplificação de bibliotecas provenientes do kit. A quantificação do DNA de fita dupla (dsDNA) foi realizada utilizando o *dsDNA High Sensitivity Assay Kit* (ThermoFisher Scientific, USA) fluorômetro 3.0 Qubit[®] (ThermoFisher Scientific, USA). A média do tamanho de cada fragmento de DNA de cada biblioteca foi mensurada usando o *High Sensitivity DNA kit* em instrumento *Agilent Bioanalyzer*[®] (Agilent Technologies, USA) conforme recomendações do fabricante. Para manter a uniformidade dos aglomerados (“*clusters*”), foram utilizadas bibliotecas com uma média do tamanho do fragmento de DNA de 240 a 300 pares de base (pb) e concentração superior a 3 ng/μl. As bibliotecas foram diluídas para 4 nM, misturadas para obtenção de um único volume (5 μl), desnaturadas com NaOH (concentração final de 0,2 N), incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), e diluídas para concentração de 20 pM com tampão de hibridização HT1 pré-refrigerado (Illumina, USA). A concentração final das bibliotecas foi diluída para 10 pM com mesmo tampão. Uma biblioteca (3% PhiX174, Illumina, USA) foi acrescentada como controle e as bibliotecas foram refrigeradas em gelo.

Sequenciamento de última geração (NGS)

O sequenciamento de última geração (NGS) foi realizado no laboratório de pesquisa em aves de produção, do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). O sequenciamento das extremidades emparelhadas foi conduzida no aparelho MiSeq da Illumina[®] usando 300 ciclos (2 x 150) e reagente *MiSeq Kit v2* (Illumina, USA). Após a geração automatizada de *clusters* no MiSeq, as leituras (“*reads*”) do sequenciamento de cada amostra foram analisadas separadamente conforme seu adaptador específicos.

Análise do sequenciamento

Os dados do sequenciamento foram analisados usando a interface da plataforma Galaxy (Afgan et al., 2016) e também utilizando trabalhos de bioinformática descritos anteriormente (Dimitrov et al., 2017). Resumidamente, a qualidade das leituras (“*reads*”) foi avaliada usando o FastQC (Andrews, 2020) e quaisquer sequências adaptadoras residuais foram aparadas usando o Cutadapt v1.6 (Martin, 2011). As leituras aparadas da

mesma granja foram agrupadas e mapeadas contra os genomas de referência *Gallus gallus* e PhiX174 usando o BWA-MEM v0.2.1 para identificar leituras da biblioteca de acometidos e controle (Li e Durbin, 2010). Essas leituras mapeadas foram filtradas usando as sequências Filter pela ferramenta de mapeamento v0.0.4 (Cock, 2020). Os pares de leitura restantes foram reunidos pelo PEAR v0.9.6.0 (Li e Durbin, 2010). A montagem *de novo* foi realizada usando o MIRA assembler v3.4.1 (Chevreux et al., 1999). Os *contigs* montados foram pesquisados no banco de dados NCBI nt (blastn). A maior semelhança foi com chicken/Hungary/Pf-CHK1/GV/2013 (número de acesso do GenBank KT880666).

Para obter um consenso final, após a clivagem do adaptador e a filtragem, as leituras foram agrupadas e importadas para o software analisador de sequências denominado Geneious v. 9.1.8 (Biomatters Ltd, Nova Zelândia). Os pares de leituras foram agrupados e foi realizada a montagem com base no alvo, usando a sequência completa do genoma do KT880666 como referência. Foram utilizadas as configurações de "alta sensibilidade" da ferramenta de mapeamento Geneious. O consenso obtido após cada execução de mapeamento foi usado como referência para uma consequente execução de mapeamento usando as mesmas configurações, para um total de cinco interações. O consenso final foi pesquisado no banco de dados NCBI nt (blastn).

Hibridização *in situ* (ISH)

Hibridização *in situ* (ISH, em inglês *in situ hybridization*) por RNAScope[®] (Advanced Cell Diagnostics, ACD; Newark, CA) foi realizada para identificar a infecção pelo Gallivirus (GV) em secções de intestino fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE, em inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*). Os genomas parciais identificados de cada lote anteriormente por meio do NGS foram usados para criar sondas (projetadas por ACD) para identificar ambos genomas. As sondas foram projetadas para detectar a mesma sequência de GV identificada por sequenciamento nestas aves e para não detectarem as seguintes sequências de picornavirus aviário: NC_039235.1 (megrivirus das galinhas estirpe chicken/B21-CHV/2012/HUN), NC_028964.1 (gallivirus das galinhas Pf-CHK1/GV), NC_024770.1 (gallivirus das galinhas 1 isolado 518C), e NC_018400.1 (gallivirus dos perus). Utilizou-se uma sonda para o RNAm de ubiquitina C de galinha (UBC) como controle positivo, e uma sonda para a *Bacillus subtilis* cepa SMY metilgloxal

sintase (*mgsA*), di-hidrodipicolinato redutase (*dapB*) e nucleotídeo oxidado pirofosfohidrolase (*ypjD*). A hibridação cruzada foi reduzida realizando análises de controle de qualidade *in silico* (Wang et al., 2012).

A ISH foi realizada em três animais com leitura para GV e três animais sem leitura abrangendo os seguintes grupos: Granja Y / Lote 2 / Galpão B (ambos com 7 dias de idade), Granja Y / Lote 4 / Galpão B (dois positivos: 7 dias de idade; 2 negativos: 3 e 7 dias de idade). O *RNAScope*[®] 2.5 *HD-Red* ISH foi utilizado em secções de jejuno FFPE de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, secções de 5 µm de espessura foram incubadas em estufa por 1h a 60 °C, desparafinizadas em xilol por 10 min, e depois lavadas em etanol 100% por 2 min. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com peróxido de hidrogênio fornecido pelo fabricante por 10 minutos a temperatura ambiente (TA). O antígeno foi recuperado por incubação por 15 min a 98-102 °C, seguido de *protease Plus* (ACD) a 40 °C por 15 min em câmara de hibridação HybEZTM (ACD). As lâminas foram incubadas com as sondas nas concentrações recomendadas pela ACD por 2 h a 40 °C. As lâminas foram lavadas duas vezes com *RNAScope*[®] 1 × *Wash Buffer* por 2 min à TA e depois incubadas com uma série de amplificadores cromogênicos compostos em diferentes temperaturas e tempos de incubação: Amp.1 a 40 °C por 30 min, Amp2 a 40 °C por 15 min, Amp4 a 40 °C por 15 min, Amp5 à TA por 30 min e Amp 6 à TA por 15 min. As lâminas foram lavadas duas vezes (em 1x tampão de lavagem) entre cada incubação do amplificador. As lâminas foram então incubadas por 10 min com o cromogênio à TA e lavadas rapidamente com água destilada. A coloração foi visualizada em um microscópio de luz branca após contra-coloração com hematoxilina 50% (laboratório Vector) × 2 min, secagem e aplicação de lamínulas com *EcoMount* (BioCare Medical).

Resultados

Histórico e sinais clínicos

Foram utilizados frangos de corte da linhagem Cobb500[®]. Os pintinhos eram alojados em galpão escuro de pressão negativa (galpão B e C) ou em galpão convencional de pressão positiva (galpão A, D, E e F). O número de aves por galpão variava de 30 a 40 mil. Era fornecida água por bebedouro do tipo “nipple” e ração em farelo *ad libitum*. Os

pintinhos eram criados em galpões com chão de concreto com cama de frango de casca de arroz. As precauções higiênicas incluíam uso de propé separados na entrada do galpão, mas não incluíam pedilúvio. Não havia gatos ou cães nas granjas.

Os pintinhos eram imunizados com vacinas contra as doenças de Gumboro, Newcastle e Marek. Essas vacinas foram administradas *in ovo* ou com um dia de idade.

Os lotes de pintinhos de três dias ou mais apresentaram sinais clínicos característicos de RSS. Os principais sinais clínicos foram retardo de crescimento (Figura 1A e B) e apatia (Figura 1C), seguidos de alimento mal digerido nas fezes, diarreia e raramente apresentaram desenvolvimento anormal das penas. A taxa de mortalidade dos lotes na primeira semana variou de 0,5 a 1,9%.

O peso dos pintinhos de três a nove dias foi obtido. Como esperado, o peso médio dos pintinhos com sinais clínicos de RSS foi menor que o peso médio para esse lote (Tabela 2).

Tabela 2: Média do peso (em gramas) e desempenho dos pintinhos/lotos acometidos pela síndrome do definhamento e refugagem (RSS).

Granja/Lote/Galpão	Idade	Sexo	Média de peso do lote (g)	Média de peso dos pintinhos com sinais clínicos (g)	Perda de peso (%)
Z/6/F	6 dias	Misto	134,97	96,33	28,6%
Y/3/B	3 dias *	Macho	86,2	67,53	21,6%
Y/3/B	7 dias*	Macho	139,01	116,11	16,4%
W/5/E	9 dias	Macho	191,20	120,46	36,9%

*Provenientes do mesmo lote.

Necropsia

Os achados macroscópicos foram visualizados principalmente no intestino delgado dessas aves. A serosa do intestino delgado era mais esbranquiçada do que o normal, e o lúmen estava frequentemente distendido por gás e continha conteúdo aquoso ou espumoso (Figura 1D), com alimento não digerido (Figura 1E). Alguns pintinhos tinham hiperemia na serosa do intestino delgado. Não foram observadas alterações macroscópicas em outros órgãos.

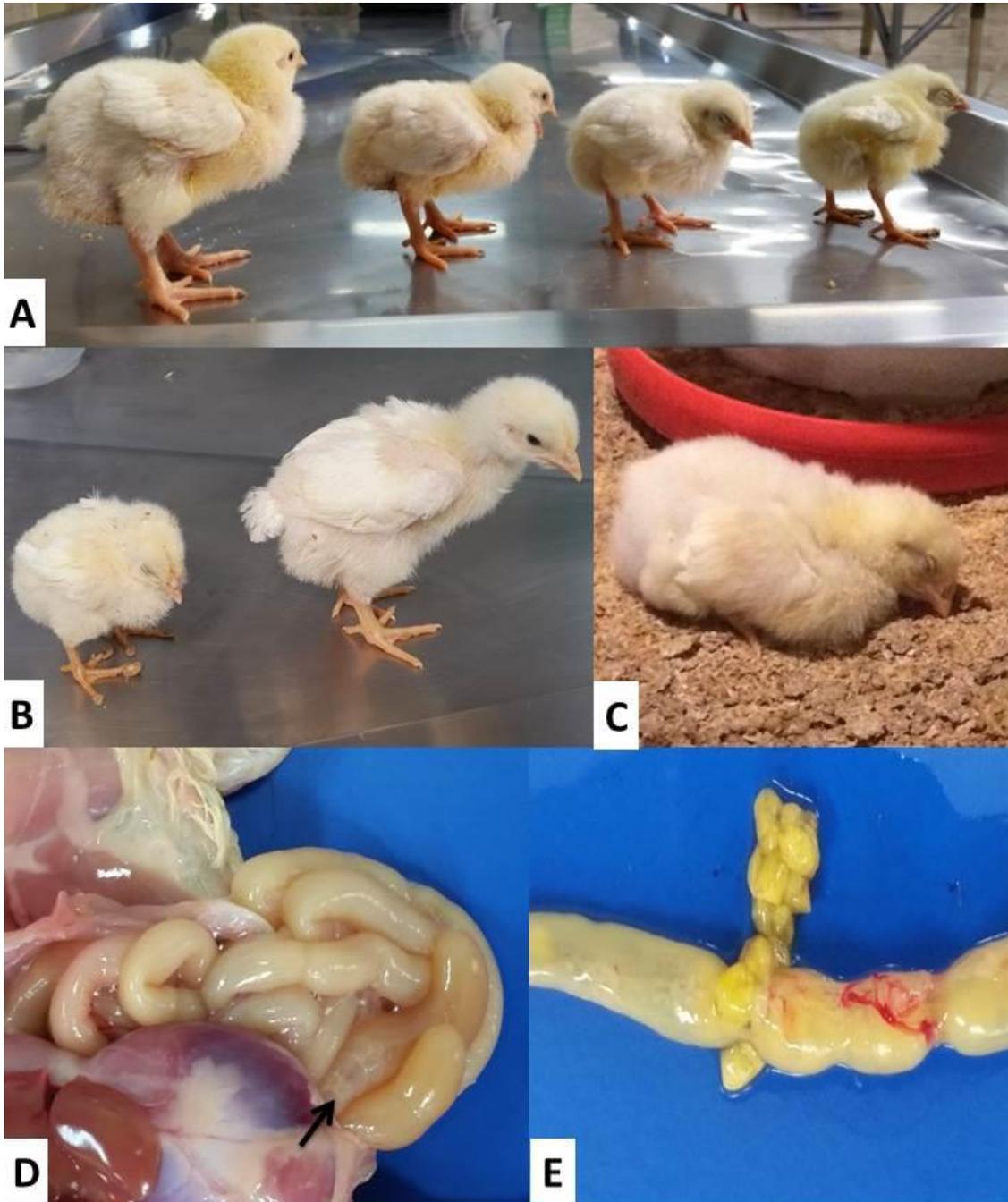


Figura 1. Alterações clinicopatológicas de pintinhos com síndrome do definhamento e refugagem (RSS). A) Atraso no crescimento caracterizado pela diferença no tamanho de pintinhos de 6 dias de idade da granja Z. B) Diferença no tamanho entre pintinhos doente (esquerda) e saudável (direita) com 11 dias da granja Y. C) Pintinho de 7 dias apresentando apatia no galpão B da granja Y. D) Intestino delgado com a serosa mais esbranquiçada, lúmen distendido por gás e com conteúdo aquoso (seta). E) Alimento parcialmente digerido em secção do jejuno.

Histopatologia

Nos pintinhos de três dias de idade (n = 60) não havia lesões histológicas. No entanto, nos pintinhos de seis a 11 dias de idade as lesões eram típicas da RSS (n = 108).

Lesões histológicas de pintinhos acometidos pela RSS (n = 108) incluíram atrofia e fusão das vilosidades com intensidade discreta a acentuada e criptas dilatadas e/ou em necrose (Figura 2A e B). Considerando os três segmentos (n = 324), as criptas dilatadas foram encontradas em 166 (51,2%) segmentos. Criptas em necrose estavam presentes em 158 (48,8%) segmentos e eram caracterizadas por enterócitos com cariorrexia e cariólise e geralmente com perda da arquitetura e conformação das criptas (Figura 2C). As criptas dilatadas tinham enterócitos achatados e lúmen preenchido por restos celulares e heterófilos (Figura 2D, E e F).

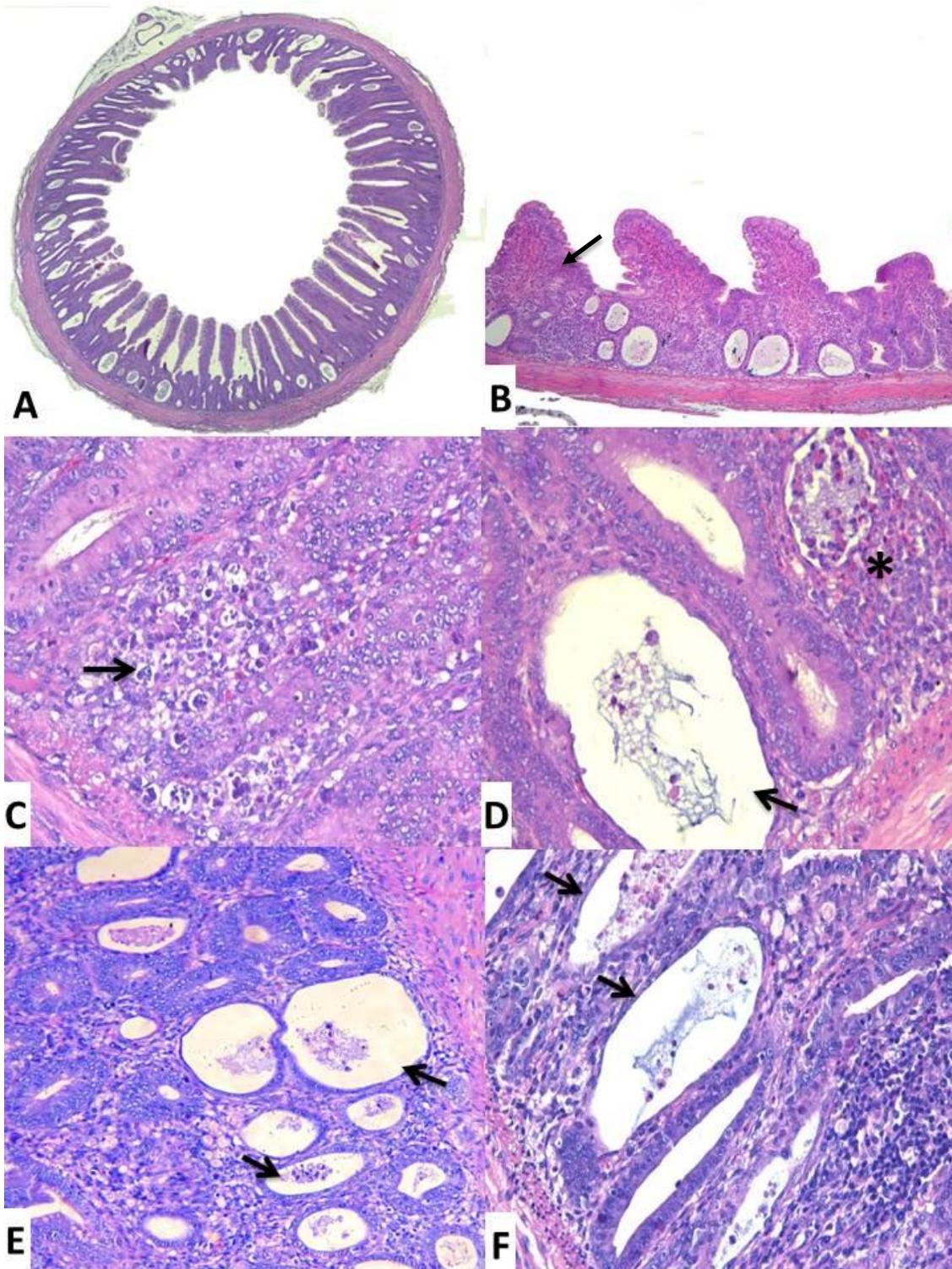


Figura 2. Achados histopatológicos em pintinhos acometidos pela síndrome do afinamento e refluxagem (RSS). A) Imagem submacroscópica do jejuno com várias criptas dilatadas. Hematoxilina e eosina (HE). B) Atrofia e fusão (seta) das vilosidades acentuada. HE, jejuno, 100×. C) Cripta em necrose (seta) com cariorrexia e cariólise dos enterócitos. HE, jejuno, 400×. D) Cripta dilatada (seta) e cripta necrótica com numerosos heterófilos (asterisco). HE, jejuno, 400×. E) Múltiplas criptas com dilatação acentuada

(seta) e restos celulares no lúmen. HE, jejuno, 200x. F) Criptas dilatadas caracterizadas por enterócitos achatados e lúmen preenchido por restos celulares (seta). HE, jejuno, 400x.

Em todos os casos de seis a 11 dias de idade com lesões histológicas, o segmento com maior número de criptas acometidas foi o jejuno, com uma média de 14,4% das criptas lesionadas, seguido pelo íleo (6,7%) e finalmente pelo duodeno (5,5%). Cronologicamente, havia predominantemente necrose nas criptas, seguida por uma alta proporção de criptas dilatadas (Figura 3).

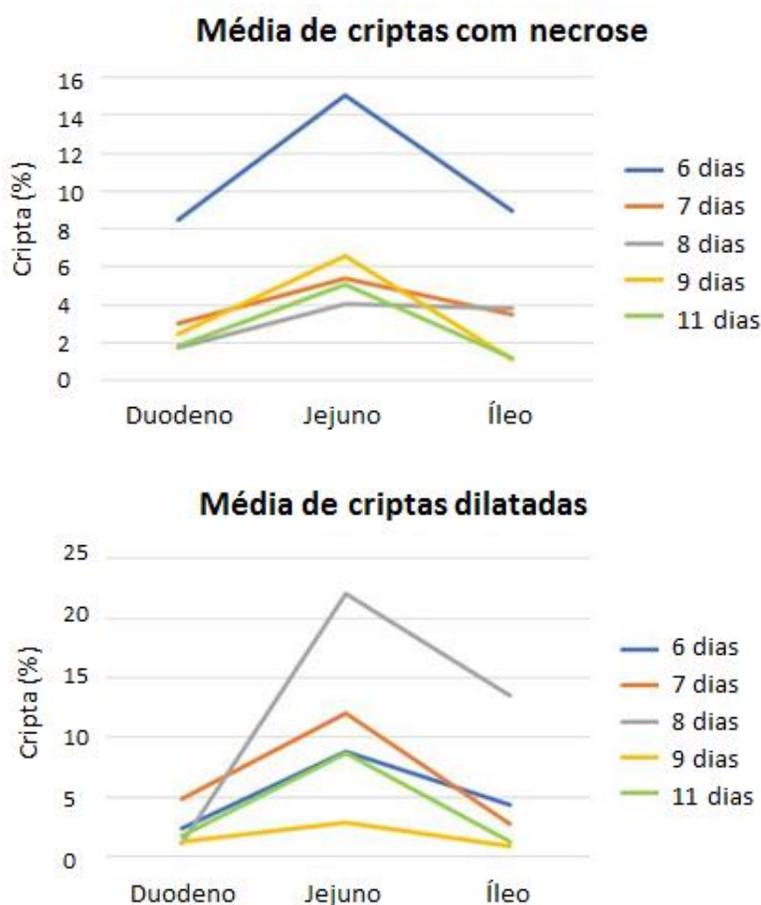


Figura 3. Média de criptas em necrose e dilatadas (em porcentagem) de pintinhos de seis a 11 dias de idade com lesões histológicas.

A lâmina própria geralmente estava expandida por infiltrado discreto e multifocal composto por heterófilos, macrófagos e/ou linfócitos e plasmócitos (Figura 4A e B). Os pintinhos (n = 108) tinham um ou mais tipos de células inflamatórias (heterófilos,

macrófagos e/ou linfócitos e plasmócitos). A maioria dos 324 segmentos classificados com inflamação discreta era formada principalmente por macrófagos (286/324; 88,3%), enquanto os classificados com inflamação moderada ou acentuada continham mais linfócitos e plasmócitos (146/324; 45,1%). Além disso, a infiltração moderada a acentuada foi mais frequente nos casos com maior número de criptas dilatadas (103/166; 62%) do que de criptas com necrose (72/158; 45,5%). O número de criptas com lesão tinha relação direta com a quantidade de células inflamatórias, pois nos segmentos com lesões acentuadas na cripta o número de células inflamatórias foi maior. Os macrófagos continham microvacúolos intracitoplasmáticos e estavam localizados principalmente próximo das criptas necróticas/dilatadas. Os heterófilos costumavam estar localizados no terço médio das vilosidades ou nas proximidades das criptas com lesão. Linfócitos e plasmócitos não tinham um local específico. Não foi observada relação entre idade e intensidade das células inflamatórias.

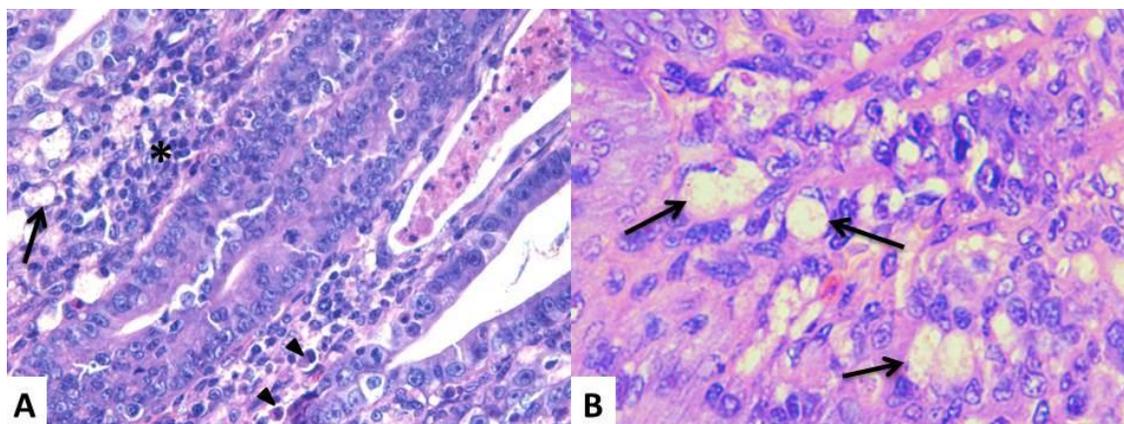


Figura 4. Células inflamatórias no jejuno de pintinhos acometidos pela síndrome do definhamento e refugagem (RSS). A) Alguns macrófagos (seta), linfócitos (asterisco) e plasmócitos (cabeça da seta) próximos a uma cripta com dilatação discreta. Hematoxilina e eosina (HE). 400×. B) Moderada quantidade de macrófagos (seta) expandindo a lâmina própria. HE, 400×.

Outros órgãos como baço, timo, fígado, pulmão, coração, rim, ventrículo, proventrículo, pâncreas, tonsilas cecais e bolsa cloacal não tiveram lesões histológicas. No entanto, poucos pintinhos de 7 dias de idade apresentaram criptas com dilatação ou/ou necrose discreta, com infiltrado leve e multifocal de heterófilos e/ou linfócitos e plasmócitos no ceco. Raramente esses casos apresentavam inflamação sem alterações nas criptas. Os pintinhos com lesões no ceco geralmente tinham dilatações moderadas a acentuadas nas criptas do jejuno.

Morfometria

A morfometria dos pintinhos de 7 dias revelou diferença significativa na diminuição da altura das vilosidades do jejuno e íleo dos pintinhos doentes em comparação aos saudáveis. Além disso, houve diferença estatística no aumento da profundidade das criptas do duodeno e íleo (Figura 5) e da altura das vilosidades do duodeno dos pintinhos doentes em relação aos saudáveis.

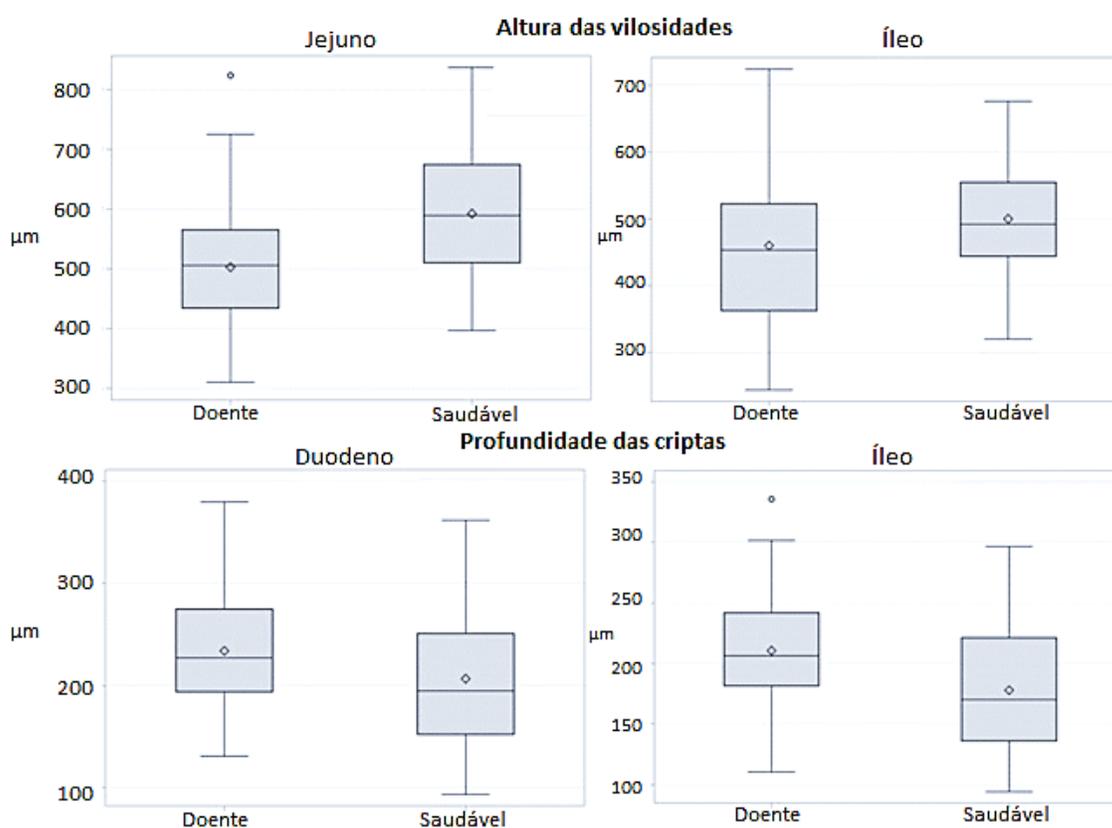


Figure 5. Diagrama de caixa representando a altura de vilosidade e profundidade de cripta (em micrometros) de pintinhos com a síndrome do definhamento e refugagem (RSS) e saudáveis. As linhas que se estendem da caixa são os valores máximos e mínimos. O valor da mediana está representado pela linha que corta a caixa. ◊ valor atípico ◊ média.

Avaliação e isolamento do RNA

A concentração total de RNA das 25 amostras FFPE variou de 62–2321,4 ng/µl. As relações 260/280 foram 1,9–2,04, e os valores do número de integridade do RNA (RIN) foram de 1,4–2,7.

Sequenciamento de última geração (NGS)

O NGS foi realizado em pintinhos de 1, 3 e 7 dias de idade e foi realizado somente do jejuno porque este foi o segmento mais acometido nos pintinhos de 7 dias. Foi detectado o vírus da nefrite aviária (ANV), rotavírus aviário (AvRV) e picornavírus. Nos pintinhos de um dia nenhum vírus foi encontrado. Nos pintinhos de 3 dias somente o ANV foi detectado e nos de 7 dias foi detectado o AvRV, ANV e picornavírus (Tabela 3).

Tabela 3: Resumo dos vírus detectados em cada granja/lote/galpão com ou sem lesões histológicas usando sequenciamento de última geração (NGS).

# de amostras/ pintinhos	Granja/Lote/ Galpão	Idade	Lesão Histológica	Vírus (# pintinhos infectados)
3	X / 1 / A	3 dias	NÃO	Vírus da nefrite aviária (n = 2)
2	Y / 2 / B	7 dias	NÃO	Vírus da nefrite aviária (n = 2)
6			SIM	Vírus da nefrite aviária (n = 5) Rotavírus gp F (n = 1) <i>Gallivírus</i> (n = 3)
3		1 dia*	Não realizado	Nenhum virus
3		3 dias	NÃO	Vírus da nefrite aviária (n = 3)
2	Y / 3 / B		NÃO	Vírus da nefrite aviária (n = 2) Group F Rotavirus (n = 2) <i>Gallivírus</i> (n = 1)
6		7 dias	SIM	Vírus da nefrite aviária (n = 6) Rotavírus gp F(n = 2) Rotavírus gp D (n = 1) <i>Gallivírus</i> (n = 6)

*proveniente do incubatório antes de ser alojado no galpão.

As leituras virais descritas foram identificadas em pintinhos com e sem lesões histológicas de RSS. O teste exato de Fisher mostrou que apenas a presença do RNA do picornavírus foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O sequenciamento produziu 22.743.342 leituras. Após filtrar e separar as sequências de boa qualidade, restaram 123.433 pares de leitura. Essas leituras foram agrupadas e no consenso final, obtido a partir de 560 leituras mapeadas, havia 8.604 pb de comprimento e com quatro *contigs* - 983 pb, 209 pb, 1.089 pb e 4.653 pb. Os resultados finais do consenso mostraram que o vírus identificado é distinto dos picornavírus de galinhas isolados em diferentes países. A maior semelhança foi de 82,79% com um novo picornavírus (chicken/CHK1/USA/2010, JF424824). Porém,

como apenas o genoma parcial do chicken/CHK1/USA/2010 está disponível, o alinhamento foi realizado com apenas 3.210 pb. O segundo e o terceiro melhores resultados foram com o chicken/Hungary/Pf-CHK1/GV/2013 (KT880666) e chicken/HongKong/518C/2010 (KF979337) com 75,45% e 75,21% de identidade nucleotídica, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados das semelhanças das sequências para cada um dos *contigs* separados no consenso final.

<i>Contig</i>	Tamanho (pb)	Sobreposição do segmento com o gene do picornavírus	Identidade nucleotídica dos melhores resultados conforme blastn			
			KT880666	KF979337	JQ691613	JF424824
1	983	5' UTR L	79,90 %	80,07 %	72,56 %	NA
2	209	VP0	70,19 %	69,81 %	NA	NA
3	1.089	VP0 VP3	67,12 %	67,24 %	65,35 %	NA
4	4.653	2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D, 3' UTR	75,45 %	75,21 %	75,79 %	82,79 %

*NA = não aplica.

A permanência dos vírus no ambiente foi avaliada coletando-se pintinhos de dois lotes diferentes (2 e 3) e alojados no mesmo galpão (B) em momentos diferentes. Os pintinhos de 7 dias alojados neste galpão tinham AvRV, ANV e GV. Posteriormente, pintinhos de 1 dia foram coletados antes de serem alojados no galpão supracitado e não apresentaram vírus no NGS, mas aos 7 dias foram positivos para os mesmos vírus do lote anterior.

Hibridização *in situ* (ISH)

A ISH RNAScope[®] foi realizada usando os mesmos blocos/pintinhos de 7 dias de idade usados para NGS para associar presença ou ausência de lesões com infecção por GV. Todos os pintinhos, incluindo aqueles negativos no NGS e sem lesões histológicas, tiveram marcação positiva de ISH para GV nas células epiteliais. Pintinhos com lesões e positivos para GV no NGS tinham mais áreas/células com marcação positiva (Figura 6A) do que os negativos no NGS e sem lesões (Figura 6B). A localização da marcação positiva para o GV pelo ISH era multifocal na mucosa, principalmente nas células epiteliais das criptas aparentemente normais (Figura 6C) e na lâmina própria associada a folículos linfoides (Figura 6D). A marcação positiva não foi visualizada nas criptas com necrose ou dilatadas. Nenhuma marcação positiva foi observada nos tecidos do controle negativo.

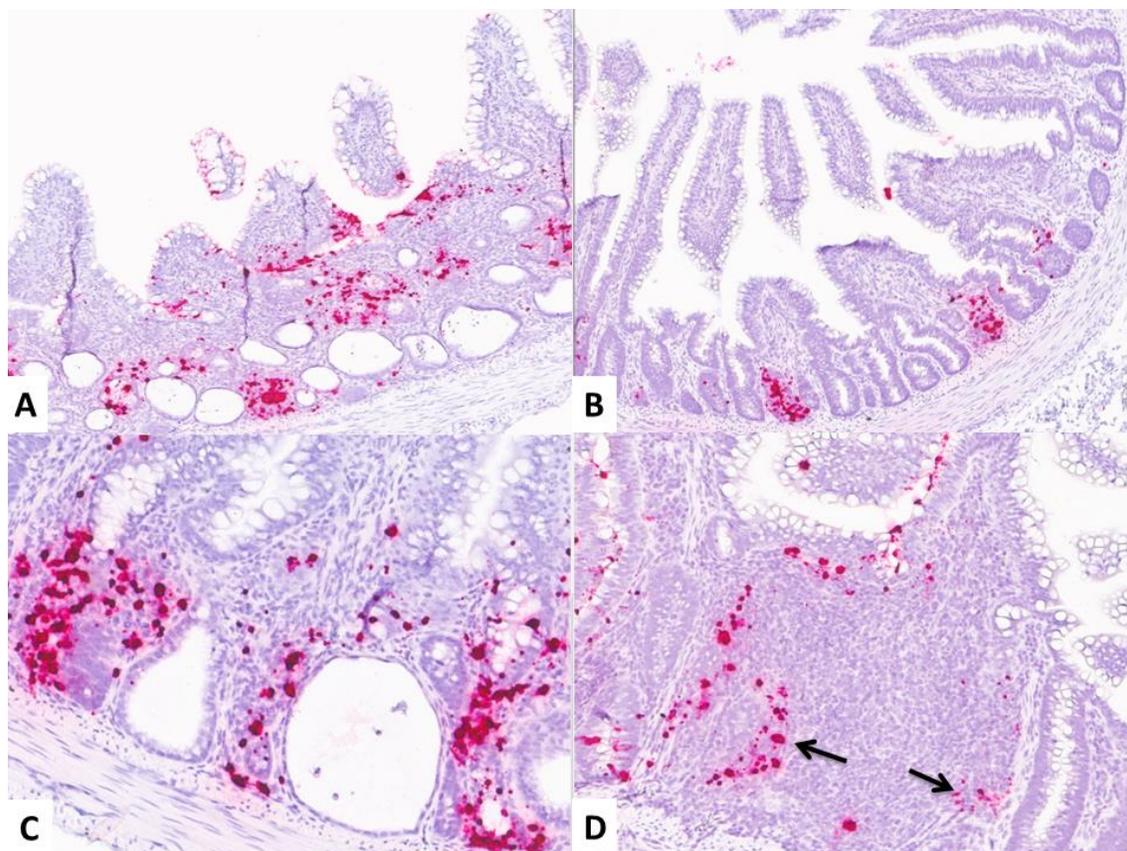


Figura 6. Marcação positiva na hibridização in situ (ISH) para *Gallivirus* (GV) na mucosa do jejuno. A) Muitas áreas/células com marcação positiva em pintinhos com lesões intestinais e positivos para GV no sequenciamento de última geração (NGS). ISH, 100×. B) Poucas áreas/células com marcação positiva em pintinhos sem lesões e negativos para o GV no NGS. ISH, 100×. C) Marcação positiva nas células epiteliais das criptas normais. ISH, 200×. D) Marcação positiva associada a folículos linfóides (seta). ISH, 200×.

Discussão

Considerando as lesões intestinais da histologia e morfometria, uma perda econômica importante pode ser inferida para os lotes examinados neste estudo. O baixo desempenho é resultado do funcionamento prejudicado do sistema gastrointestinal, uma vez que o intestino é o local de absorção de nutrientes, principalmente o jejuno (Isshiki et al., 1989), que foi o segmento mais acometido em nossa pesquisa. As doenças entéricas virais são caracterizadas por danos ao epitélio entérico, incluindo distúrbios das enzimas digestivas localizadas na região dos microvilos dos enterócitos maduros ou perda de enterócitos. Isso resulta na má digestão, má absorção e diarreia (Rebel et al., 2006).

O peso médio dos pintinhos doentes de 3 a 9 dias de idade foi 26% menor que o peso médio dos pintinhos saudáveis, e isso é um sinal clínico comum em pintinhos

acometidos por RSS (Montgomery et al., 1997; Qamar et al., 2013; Hauck et al., 2016). O peso aos 7 dias é uma referência importante para o bom desempenho no abate, pois o peso nessa idade tem uma relação positiva com o peso do frango na idade de abate (Rocha et al., 2008). Perdas como as observadas nos pintinhos acometidos são muito prejudiciais para o desempenho do frango e, conseqüentemente, são responsáveis por consideráveis perdas econômicas para o produtor. Apesar disso, geralmente não há aumento relevante da taxa de mortalidade.

Embora inespecíficos, os sinais clínicos descritos nas aves do presente estudo foram similares aos descritos em pintinhos com RSS em outros estudos. Estes sinais incluem atraso do crescimento, apatia, diarreia e empenamento defeituoso (Kisary 1985; Zavala e Sellers, 2005; Otto et al., 2006; Mettifogo et al., 2014). Os achados macroscópicos deste estudo incluíram intestino com a serosa mais esbranquiçada, lúmen distendido por gases, com conteúdo aquoso/espumoso e alimento não digerido e, em alguns casos, serosa intestinal hiperêmica, como consistente com relatos anteriores (Songserm et al., 2000; Rebel e Balk, 2006; Zsak et al. , 2013). Alguns autores descreveram atrofia de órgãos linfoides, como bolsa cloacal, timo e baço (Lublin et al. 2004; Palade et al., 2011), mas em nossos casos, esses achados não estavam presentes.

Os pintinhos de três dias não apresentaram lesões histológicas, estas foram observadas apenas a partir do sexto dia de idade. Não foram coletados pintinhos de quatro e cinco dias de idade, portanto não foi possível afirmar exatamente quando as lesões começaram. Um estudo revelou que lesões histológicas foram observadas em pintinhos de quatro dias e a gravidade da lesão aumentava depois disso. A ocorrência e a intensidade das lesões diminuía para os pintinhos com mais de 14 dias de idade (Nilli et al., 2007) ou 20 dias de idade (Davis et al., 2013, Qamar et al., 2013). Portanto, o diagnóstico histopatológico pode ser realizado com 6 a 11 dias de idade, pois nessa idade existem lesões típicas da RSS.

Lesões histológicas, incluindo atrofia e fusão das vilosidades, criptas dilatadas (cistos) e necrose das células epiteliais das criptas também foram descritas (Zavala e Sellers, 2005; Otto et al., 2006; Kang et al., 2012) e estavam presentes nos pintinhos do presente estudo. Outras lesões descritas incluem degeneração e vacuolização de células acinares pancreáticas com fibrose, proventriculite com degeneração glandular e infiltrado

de macrófagos e linfócitos (Songserm et al., 2000; Qamar et al., 2013) e atrofia da bolsa cloacal (Qamar et al., 2013). Essas observações não foram encontradas em nossa pesquisa. A presença, distribuição e intensidade das lesões podem variar de acordo com a idade dos pintinhos, a evolução da doença e também podem ter influência da etiologia.

O jejuno é o segmento do intestino delgado mais afetado pela RSS (Songserm et al., 2000; Zekarias et al., 2005; Rebel et al., 2006; ter Veen et al., 2017). Embora o jejuno também tenha sido o segmento mais lesionado, nosso estudo mostrou que o duodeno e o íleo também são acometidos, portanto, não devem ser ignorados para o diagnóstico.

Em todos os segmentos, a necrose das criptas estava mais presente em pintinhos de 6 dias de idade, e depois de um ou dois dias houve predominância da dilatação das criptas. Posteriormente, houve maior número de criptas necróticas em pintinhos de 9 dias de idade, seguido novamente por predominância de criptas dilatadas aos 11 dias. Esse padrão de lesão histológica sugere que o vírus, provavelmente durante a fase de replicação, causa necrose e restos celulares se acumulam no interior das criptas, resultando em dilatação da mesma, como já observado em outros estudos (Rebel et al., 2006; ter Veen et al., 2017). Um estudo demonstrou que a degeneração dos enterócitos da cripta ocorreu a partir de 3 dpi e uma distensão cística notável das criptas com atrofia das vilosidades acentuada com 5 e 7 dpi (Zekarias et al., 2005), achados semelhantes a estes foram encontrados em nosso estudo.

Em nosso estudo, a lâmina própria do intestino geralmente estava expandida por infiltrado de heterófilos, macrófagos e/ou linfócitos e plasmócitos. Alguns pesquisadores relataram principalmente infiltração de macrófagos e linfócitos no intestino delgado (Songserm et al., 2000; ter Veen et al., 2017). Um estudo experimental descreveu que a infiltração de heterófilos também estava na mucosa intestinal e revelou que era mais pronunciada 3 dpi e reduzia a partir do dia 5 PI (Zekarias et al., 2005). O papel exato das células inflamatórias nos pintinhos afetados pela RSS não está claro. Subjetivamente, nosso estudo mostrou que a intensidade das lesões nas criptas geralmente era maior com uma quantidade elevada de células inflamatórias, sugerindo que a inflamação desempenha um papel na patogênese da RSS. O infiltrado inflamatório pode ser desencadeado por citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos enterócitos acometidos e pelas células inflamatórias presentes na lâmina própria (Madara et al., 1991; Jung et al., 1995). As células

inflamatórias podem ser benéficas na defesa do hospedeiro porque fagocitam restos celulares e agentes infecciosos, mas em alguns casos a alta quantidade de células inflamatórias pode resultar em danos aos tecidos e prejudicar a função intestinal (Madara et al., 1991; Songserm et al., 2003) Os heterófilos, por exemplo, podem produzir fator de necrose tumoral - α e óxido nítrico e induzir a apoptose (Choi e Chae, 2002).

A redução da altura das vilosidades do jejuno foi descrita como um achado em pintinhos acometidos pela RSS, mas sem morfometria e testes estatísticos para comprovar a significância da atrofia (Rebel et al., 2006; ter Veen et al., 2017). Apenas um estudo com AvRV realizou morfometria em pintinhos entre 5 e 14 dias de idade. Este estudo descreveu atrofia das vilosidades acentuada que se estendia da porção cranial do jejuno até o íleo, com predominância de lesões na porção média a distal do intestino delgado (Otto et al., 2006). Também encontramos atrofia significativa das vilosidades no jejuno e íleo.

A atrofia das vilosidades é resultado da necrose epitelial e da inibição da proliferação celular na base das criptas, o que impede a migração dessas células para o topo das vilosidades (Rebel et al., 2006). Por outro lado, um estudo não encontrou diferenças significativas entre a profundidade da cripta ou a altura das vilosidades (Zekarias et al., 2005) e sugeriu que, concomitantemente à apoptose epitelial, a regeneração era capaz de recuperar as criptas e as vilosidades. Foi sugerido que a proliferação das criptas poderia ser uma reação à apoptose epitelial e poderia ser estimulada por citocinas inflamatórias (Stappenbeck et al., 1998). Além disso, também indica recuperação com regeneração intestinal caracterizada por hiperplasia do epitélio das criptas e recuperação do comprimento das vilosidades (Otto et al., 2006; ter Veen et al., 2017). Nossos achados de aumento da altura das vilosidades duodenais e profundidade das criptas do duodeno e íleo podem indicar regeneração nesses segmentos, provavelmente resultado da lesão. Não foi possível avaliar cronologicamente o tipo e a intensidade da lesão no intestino delgado, uma vez que nosso estudo realizou morfometria apenas em pintinhos com 7 dias de idade, o que coincide com o período após pico de necrose das criptas. Nenhum outro estudo executou morfometria no duodeno.

Os achados histológicos no ceco provavelmente são consequência das infecções no intestino delgado. As lesões no ceco nunca foram descritas antes (Otto et al., 2006). No entanto, as alterações no ceco não foram tão acentuadas quanto as do intestino delgado;

portanto, as alterações no ceco provavelmente não são clinicamente significativas. As lesões nos órgãos linfoides provavelmente estavam ausentes porque estas já foram descritas em pintinhos infectados pelo ChPV (Palade et al., 2011) e ARV (Alfieri, 1989) e em nossos casos esses vírus não foram encontrados.

O NGS de segmentos de jejuno de pintinhos com 3 e 7 dias de idade revelou alguns vírus em pintinhos acometidos ou não por RSS, incluindo ANV, AvRV e GV. O ANV já foi relatado anteriormente no Brasil (Mettifogo et al., 2014; Nuñez et al., 2016; De la Torre et al., 2018; Lima et al., 2019) e em outros países (Day et al., 2007; Roussan et al., 2012; Devaney et al., 2016; ter Veen et al., 2017). O AvRV também já foi relatado no Brasil (Mettifogo et al., 2014; Mascarenhas, et al., 2016; Nuñez et al., 2016; De la Torre, et al., 2018; De la Torre, et al., 2019; Lima et al., 2019) e em outros países (Otto et al., 2006; Pantin-Jackwood et al., 2008; ter Veen et al., 2017). ANV e AvRV foram detectados em frangos de corte de Minas Gerais anteriormente e em infecção concomitante (Mettifogo et al., 2014; Nuñez et al., 2016; De la Torre, et al., 2018). Semelhante aos nossos achados, alguns pesquisadores detectaram ANV em pintinhos com 3 e 7 dias, mas o AvRV só foi detectado aos 8 dias de idade (De la Torre et al., 2018), divergindo de nosso estudo onde o AvRV foi detectado em pintinhos aos 7 dias de idade. Finalmente, o vírus mais recentemente encontrado em pintinhos com sinais clínicos de RSS foi um vírus pertencente à família Picornaviridae. Este foi detectado apenas pelo teste NGS, primeiro no Reino Unido (Devaney et al., 2016) e recentemente no Brasil (Lima et al., 2019). É a primeira vez que esse vírus, semelhante ao GV, é relatado em frangos de corte de Minas Gerais.

Nosso estudo encontrou mais casos infectados por ANV do que AvRV em pintinhos com e sem lesões histológicas. Como em nossos achados, alguns autores detectaram principalmente ANV causando a síndrome (Pantin-Jackwood et al., 2008; Roussan et al., 2012; Koo et al., 2013) e, em outros casos, em galinhas saudáveis (Mettifogo et al., 2014; Devaney et al., 2016). Uma baixa incidência de AvRV foi mencionada anteriormente (McNulty et al. 1983; Roussan et al. 2012; Mettifogo et al., 2014), porém uma pesquisa só encontrou uma alta prevalência de pintinhos com esse vírus aos 14 dias de idade (Pantin-Jackwood et al., 2008), justificando porque o AvRV não foi frequente em nossa análise. Apesar da detecção do AvRV em pintinhos tanto na primeira semana, quanto aos 14 dias, mesmo na presença de anticorpos maternos (McNulty et al., 1983; Meulemans et al., 1985).

O rotavírus pode ser dividido em grupos (gp) e sabe-se que o local de replicação desse vírus varia de acordo com o grupo. O AvRV gp A é encontrado principalmente no duodeno e o gp D no jejuno e íleo (McNulty et al., 1983). Em nosso estudo, o NGS foi realizado apenas no jejuno, detectando AvRV gp D e F. Encontramos mais pintinhos infectados por AvRV gp F (n = 5; 20%) do que pelo gp D (n = 1; 4%), em contraste com outros autores que descreveram predominância de infecção por AvRV gp D (65,9%) e raros casos infectados pelo gp F (Otto et al., 2012). Talvez, a diferença geográfica seja uma razão para os resultados distintos, uma vez que o AvRV gp F já foi descrito no Brasil (Mascarenhas et al., 2016). Assim como em nossa pesquisa, um estudo relatou o AvRV gp F em pintinhos saudáveis e doentes e o gp D apenas em pintinhos doentes (Otto et al., 2006).

A ausência de vírus em pintinhos de um dia sugere que os vírus estudados no presente trabalho poderiam não estar presentes no jejuno, nessa idade. Alguns autores sugeriram a transmissão vertical do ANV, uma vez que foi detectado em frangos de corte na primeira semana de idade (Takase et al., 1989; De la Torre et al., 2018) e outros encontraram o AvRV em incubatórios (Pantin-Jackwood et al. 2008). A presença dos mesmos vírus (AvRV, ANV e GV) encontrados no lote anterior alojado no mesmo galpão sugere que esses vírus são resistentes e podem permanecer no ambiente, mesmo com uma boa higiene e saneamento. Estas informações são consistentes com o atual conhecimento sobre astrovírus, rotavírus e picornavírus e sua relativa estabilidade no ambiente (Rzeżutka e Cook, 2004). O AvRV, por exemplo, pode sobreviver no esterco por quase 60 dias (Boone e Gerba, 2007) e até 6 meses no ambiente (Sobsey e Meschke, 2003). Provavelmente os vírus estavam presentes no ambiente e a limpeza e desinfecção não foram eficazes para eliminá-los, pois foram detectados em lotes consecutivos alojados no mesmo galpão. Além disso, a reutilização da cama de frango deve ser considerada e não foi possível descartar a transmissão horizontal por fômites, por exemplo, embora as granjas possuam biossegurança adequada para o controle de doenças. A presença de anticorpos maternos com proteção cruzada também pode ser considerada em pintinhos infectados que não desenvolveram lesões intestinais.

O teste estatístico mostrou que a detecção de GV foi significativamente associada a lesões histológicas (p <0,05). O ANV foi detectado em pintinhos saudáveis e doentes e o

AvRV em baixa prevalência, por isso foi difícil estabelecer relações diretas. O vírus pertencente à família Picornaviridae foi relatado apenas em pesquisas metagenômicas, mas nunca foi diretamente relacionado à RSS. Uma pesquisa detectou um alto número de leituras (“reads”) de vírus pertencente à família Picornaviridae em um pool de fezes de frango de corte com 3 a 5 semanas de idade, apresentando sinais clínicos característicos da RSS. Mas, este estudo encontrou muitos outros vírus pelo NGS, tornando impossível associar qualquer vírus ou um vírus em particular à síndrome (Lima et al., 2019). Outro estudo metagenômico observou que a família viral mais abundante identificada foi a Picornaviridae, tanto em pintinhos saudáveis quanto doentes (Devaney et al., 2016).

Os achados da ISH mostraram que o GV não estava presente nas lesões, apesar de que a estatística dos dados do NGS revelou que a detecção de GV estava significativamente associada a lesões histológicas, sugerindo que esse vírus pode desempenhar papel na patogênese da RSS. Estudos anteriores sugeriram que alguns vírus desempenham importante papel nessa síndrome multifatorial, como astrovírus (ANV e CAstV) (Roussan et al., 2012), IBV (Mettifogo et al., 2014) e ARV (Goodwin et al., 1993; Montgomery et al., 1997). Em nosso estudo, os ácidos nucléicos do GV foram detectados pela ISH na mucosa intestinal de pintinhos com e sem lesões. As razões para a falha na detecção do GV pelo NGS em tecidos de pintinhos sem lesões ainda precisam ser elucidadas. Embora o NGS seja uma técnica altamente sensível, é possível que nessas seções houvesse pouca quantidade de RNA que foi degradado durante o processo. A divergência de resultados entre diferentes técnicas também foi observada em um estudo com ChPV que encontrou PCR positivo e imuno-histoquímica (IHQ) negativa nas mesmas amostras de tecido (Day e Zsak, 2013). Os autores especularam que as seções analisadas apresentavam menos células suscetíveis à replicação do vírus. Estes dados mostram a importância de realizar mais de um teste nas amostras principalmente na área da pesquisa.

Considerações finais

As lesões intestinais verificadas pela histopatologia nas aves desse estudo foram relacionadas com os sinais clínicos típicos da RSS. O atraso no crescimento com perda de peso, foi o principal sinal clínico observado no presente estudo, confirmando que há perda

econômica para o produtor. As alterações histológicas estavam ausentes em pintinhos de 3 dias e presentes aos 6 e 11 dias de idade.

O jejuno é o segmento de preferência para o diagnóstico, embora também sejam encontradas lesões no duodeno e íleo, com menor frequência. As lesões histológicas características da RSS foram de necrose e criptas dilatadas em diferentes intensidades com infiltrado inflamatório composto principalmente por células mononucleares associadas às criptas lesionadas. A dilatação da cripta ocorreu após a necrose do epitélio como resultado do acúmulo de restos celulares no lúmen destas. Também foi observada atrofia das vilosidades e esta foi mais significativa no jejuno e íleo. Portanto, o jejuno de pintinhos de 6 a 11 dias é o melhor segmento para diagnosticar a RSS por meio da histopatologia.

Diversas associações entre vírus foram demonstradas, tornando a conclusão da verdadeira etiologia um desafio nessa doença. Pintinhos de granjas de Minas Gerais apresentam ANV no jejuno no terceiro dia de idade, seguido pelo AvRV e GV aos 7 dias. Vírus em pintinhos de um dia de idade foram ausentes no jejuno. O GV detectado nas secções de jejuno pelo NGS, posteriormente confirmado na mucosa pela ISH, não está diretamente relacionado à lesão, pois havia marcação positiva nas células das criptas aparentemente normais. No entanto, pintinhos com lesões histológicas apresentaram mais marcação positiva de ISH nas células do que naqueles sem lesões, levantando a questão se o vírus pode estar envolvido no desenvolvimento das lesões e, conseqüentemente, dos sinais clínicos.

Vírus que causam a RSS podem ser encontrados em pintinhos saudáveis. Em nosso estudo, ANV e AvRV foram encontrados em pintinhos sem lesões histológicas. Isto mostra a importância de associar testes moleculares à histopatologia, uma vez que vírus estão presentes no intestino e o teste molecular será positivo. Além disso, neste estudo, a ISH foi fundamental para compreender que o GV está presente no jejuno dos pintinhos afetados pela RSS, mas não está diretamente associado às lesões.

O controle da RSS inclui boas práticas de higiene como manejo correto da cama (troca ou tratamento pelo calor para reutilização), limpeza e desinfecção dos galpões, vazios sanitário e biossegurança adequada. Esta pesquisa contribui com mais informações sobre a patogênese e dinâmica epidemiológica da RSS, apesar de que mais estudos, principalmente

com testes de marcação *in situ*, são necessários para compreender o papel do ANV e o AvRV nas lesões histológicas dessas aves.

Agradecimentos

A primeira autora foi contemplada com bolsa de estudo da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) para realização do doutorado sanduíche e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante seu doutorado no Brasil. Esta pesquisa teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), com o projeto APQ-04398-16, juntamente com a *University of Georgia Research Mobility Grant Program* e o Departamento de Patologia da *University of Georgia, United States*. Este trabalho também foi apoiado pelo *Clinical Research Information System (CRIS)* [6612-32000-072-00D] do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA). Além disso, nós agradecemos a assistência técnica da Kelsey Young da *University of Georgia* e de toda equipe da Escola de Veterinária, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Referências bibliográficas

- AFGAN, E.; BAKER D.; VAN DEN BEEK M.; BLANKENBERG, D.; BOUVIER, D.; CECH, D.; CORAOR, N.; EBERHARD, C.; GRUNING, B.; GUERLER, A.; HILMAN-JACKSON, J.; VON KUSTER, G.; RASCHE, E.; SORANZO, N.; TURAGA, N.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; GOECKS, J. The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*. V. 44, n. W1, p. W3–W10, 2016.
- ALFIERI, A.F.; ALFIERI, A.A.; RESENDE, M.; RESENDE, J.S.; Detection and propagation of avian enteric reovirus in chicken. *Arq Bras Med Vet Zoot.*, v.41, p. 497–501, 1989.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (ABPA). 2019. Relatórios anuais. Disponível em: [http:// http://abpa-br.org/mercados/#relatorios](http://http://abpa-br.org/mercados/#relatorios). Acesso em: 07 fev. 2020.
- BARNES, G.L.; GUY, J.S.; VAILLANCOURT, J.P. Poultry enteritis complex. *Rev Sci Tech.*, v.19, p.565–588, 2000.
- BIDIN, M.; LOJKIC, I.; BIDIN, Z.; TILJAR, M.; MAJNARIĆ, D. Identification and phylogenetic diversity of parvovirus circulating in commercial chicken and turkey flocks in Croatia. *Avian Dis.*, v.55, p.693–696, 2011.
- BOONE, S.A.; GERBA, C.P. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *App Env Microbiol.* v. 73, p. 1687-1696, 2007.
- CHEVREUX B, WETTER T, SUHAI S. Genome sequence assembly using trace signals and additional sequence information. *German conference on bioinformatics...*v. 99, n. 1, p. 45-56, 1999.
- CHOI, C.; CHAE, C. Expression of tumour necrosis factor-alpha is associated with apoptosis in lungs of pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Research in Veterinary Science*, n. 72, p. 45-49. 2002.
- COCK, P. J. Galaxy tool for filtering reads by mapping. http://toolshed.g2.bx.psu.edu/view/peterjc/seq_filter_by_mapping. Acesso em 4 Março 2020.
- DAVIS, J. F.; KULKARNI, A.; FLETCHER, O. Reovirus Infections in Young Broiler Chickens. *Avian Diseases*, v. 57, n. 2, p. 321–325, 2013.

DAY, M.; SPACKMAN, E.; PANTIN-JACKWOOD, M. A Multiplex RT-PCR Test for the Differential Identification of Turkey Astrovirus Type 1, Turkey Astrovirus Type 2, Chicken Astrovirus, Avian Nephritis Virus, and Avian Rotavirus. *Avian Diseases*, p. 51, n. 3, p. 681-684, 2007.

DE LA TORRE, D.I.; NUÑEZ, L.F.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P. Enteric Virus Diversity Examined by Molecular Methods in Brazilian Poultry Flocks. *Vet. Sci.*, v. 5, n. 2, 38, 2018.

DE LA TORRE, D.I.D.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; CHACON, R.D.; FERREIRA, A.J.P. Sensitive SYBR Green-Real Time PCR for the detection and Quantification of Avian Rotavirus A. *Vet. Sci.*, v. 6, n. 1, pii: E2, 2019.

DEVANEY, R.; TRUDGETT, J.; TRUDGETT, A.; MEHARG, C.; SMYTH, V. A metagenomic comparison of endemic viruses from broiler chickens with runting stunting syndrome and from normal birds. *Avian Pathol.*, v.45, p.616–629, 2016.

DIMITROV, K. M.; SHARMA, P.; VOLKENING, J. D.; GORAICHUK, I. V.; WAJID, A.; REHMANI, S. F.; BASHARAT, A.; SHITTU, I.; JOANNIS, T. M.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. A robust and cost-effective approach to sequence and analyze complete genomes of small RNA viruses. *Virol J.* v. 14. n. 71, 2017.

FINKLER, F.; LIMA, D.A.; CERVA, C.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; SANTOS, H.F.; FRANCO, A.C. Chicken parvovirus viral loads in cloacal swabs from malabsorption syndrome-affected and healthy broilers. *Trop. Anim. Health Prod.*, v. 48, p. 1685–1689, 2016a.

FINKLER, F.; LIMA, D.A.; CERVA, C.; MORAES, L.B.; CIBULSKI, S.P.; TEIXEIRA, T.F.; SANTOS, H.F.; ALMEIDA, L.L.; ROEHE, P.M.; FRANCO, A.C. Chicken parvovirus and its associations with malabsorption syndrome. *Research in Veterinary Science*, v.107, p. 178–181, 2016b.

HAUCK, R.; GALLARDO, R.A.; WOOLCOCK, P.R. A Coronavirus associated with Runting Stunting Syndrome in Broiler Chickens. *Avian Dis.*, v.60, p.528–534, 2016.

ISSHIKI, Y.; NAKAHIRO, Y.; ZHOU, Z.X. Feed digestibility in different intestinal parts of chickens. *Jpn J Zootech Sci*, n. 60, p. 1082–1092, 1989.

JUNG, H.C.; ECKMANN, L.; YANG, S.K.; PANJA, A.; FIERER, J.; MORZYCKA, W.E.; KAGNOFF, M.F. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *Journal of Clinical Investigation*, n. 95, p. 55-/65, 1995.

KANG, K.; LINNEMANN, E.; ICARD, A.H.; DURAIRAJ, V.; MUNDT, E.; SELLERS, H.S. Chicken astrovirus as an aetiological agent of runting-stunting syndrome in broiler chickens. *Journal of General Virology*. v. 99, p. 512–524, 2018.

KANG, K.I.; EL-GAZZAR, M.; SELLERS, H.S.; DOREA, F.; WILLIAMS, S.M.; KIM, T.; COLLETT, S.; MUNDT, E. Investigation into the aetiology of runting and stunting syndrome in chickens. *Avian Pathol.*, v.41, p.41–50, 2012.

KAPGATE, S.S.; KUMANAN, K.; VIJAYARANI K.; BARBUDDHE, S.B. Avian parvovirus: classification, phylogeny, pathogenesis and diagnosis. *Avian Pathol.* v. 24, p. 1–10, 2018

KISARY, J. Indirect immunofluorescence as a diagnostic tool for parvovirus infection of broiler chickens. *Avian Pathol.*, v.14, p.269–273, 1985.

KOO, B.; LEE, H.; JEON, E.; JANG, H.; HAN, M.; MO, I. An unusual case of concomitant infection with chicken astrovirus and group A avian rotavirus in broilers with a history of severe clinical signs. *J. Vet. Sci.* n. 14, p. 231-233, 2013.

KOUWENHOVEN, B.; VERTOMMEN, M.H.; GOREN, E. Runting and stunting syndrome of broilers - the disease with many names and faces. International Union of Immunological Societies Proceedings no. 66, Disease Prevention and Control in Poultry Production, Sydney, pp. 73-96. 1983.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. v. 26, n. 5, p. 589-595, 2010

LIMA, D.A.; CIBULSKI, S.P.; TOCHETTO, C.; VARELA, A.P.M.; FINKLER, F.; TEIXEIRA, T.F.; LOIKO, M.R.; CERVA, C.; JUNQUEIRA D.M.; MAYER, F.Q.; ROEHE, P.M. The intestinal virome of malabsorption syndrome-affected and unaffected broilers through shotgun metagenomics. *Virus Research*, v. 261, p. 9–20, 2019.

LUBLIN, A.; MECHANI, S.; BUMBAROV, V. Involvement of rotavirus in intestinal infections of poultry and pet birds. Abstract presented at the 28th annual Israel veterinary symposium in memory of Dr. Ora Egozi, 2004. *Isr J Vet Med.* 59:3. 2004.

LUNA, L.G. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill. 258p. 1968.

MADARA, J.L.; NASH, S.; PARKOS, C. Neutrophil/epithelial cell interactions in the intestine. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, n. 314, p. 329-334. 1991.

MARGUERIE, J.; LEON, O.; ALBARIC, O.; GUY JS, GUERIN JL. Bimavirus-associated proventriculitis in French broiler chickens. *Vet. Rec.* v.169, p.394–396, 2011.

MASCARENHAS, J.D.P.; BEZERRA, D.A.M.; SILVA, R.R.; SILVA, M.J.M.; SOUSA JUNIOR, E.C.; SOARES, L.S. Detection of the VP6 gene of group F and G rotaviruses in broiler chicken fecal samples from the Amazon region of Brazil. *Arch Virol*, v. 161, n. 8, p. 2263-2268, 2016.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*. v. 17, n. 1, p. 10-12, 2011.

MCNULTY, M.S.; ALLAN, G.M.; MCCRACKEN, R.M. Experimental infection of chickens with rotaviruses: clinical and virological findings. *Avian Pathol.*, v.12, p.45–54, 1983.

METTIFOGO E.; NUÑEZ, L.F.N.; CHACÓN, J.L.; SILVANA H. SANTANDER PARRA, S.H.S; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; JEREZ, J.A.; JONES, R.C.; FERREIRA, A.J.P..Emergence of enteric viruses in production chickens is a concern for avian health. *Scient. World J.*, v.2014, ID.450423, 2014.

MEULEMANS, G.; PEETERS, J E.; HALEN, P. Experimental infection of broiler chickens with rotavirus. *Br. Vet. J.* v. 141, p.69–73. 1985.

MONTGOMERY, R.D.; BOYLE, C. R.; MASLIN, W. R.; MAGEE, D.L. Attempts to reproduce a runting/stunting type syndrome using infectious agents isolated from affected Mississippi broilers. *Avian Dis.* v. 41, p.80–92, 1997.

NILI, H.; JAHANTIGH, M.; NAZIFI, S. Clinical observation, pathology, and serum biochemical changes in infectious stunting syndrome of broiler chickens. *Comp Clin Pathol.* n. 16, p. 161–163, 2007.

NOIVA, R.; GUY, J.S.; HAUCK, R.; SHIVAPRASAD, H.L. Runting stunting syndrome associated with transmissible viral proventriculitis in broiler chickens. *Avian Dis.*, v.59, p.384–387, 2015.

NUÑEZ, L.F.N.; PARRA, S.H.S.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; CARRANZA, C.; DE LA TORRE, D.I.D.; PEDROSO, A.C.; FERREIRA, A.J.P. Detection of enteric viruses in pancreas and spleen of broilers with runting-stunting syndrome (RSS). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 5, p. 595-599, 2016.

NUÑEZ, L.F.N.; PARRA, S.H.S.; CHAIBLE, L.; DE LA TORRE, D.I.D.; BUIM, M.R.; MURAKAMI, A.; DAGLI, M.L.Z.; ASTOLFI-FERREIRA, C.S.; FERREIRA, A.J.P. Development of a Sensitive Real-Time Fast-qPCR Based on SYBR Green for Detection and Quantification of Chicken Parvovirus (ChPV). *Vet. Sci.*, v. 5, n. 3, 69, 2018.

OECD/FAO (2019), OECD-FAO Agricultural Outlook 2019-2028, OECD Publishing, Paris/Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. https://doi.org/10.1787/agr_outlook-2019-en Acesso em: 12 dez. 2019.

OTTO, P.; LIEBLER-TENORIO, E.M.; ELSCHNER, M.; REETZ, J.; LÖHREN, U.; DILLER, R. Detection of rotaviruses and intestinal lesions in broiler chicks from flocks with runting and stunting syndrome (RSS). *Avian Dis.*, v.50, p.411– 418, 2006.

OTTO, P.H.; AHMED, M.U.; HOTZEL, H.; MACHNOWSKA, P.; REETZ, J.; ROTH, B.; TROJNAR, E.; JOHNE, R. Detection of avian rotaviruses of groups A, D, F and G in diseased chickens and turkeys from Europe and Bangladesh. *Vet Microbiol.*, v.156, p.8–15, 2012.

PAGE, R.K.; FLETCHER, O.J.; ROWLAND, G.N.; GAUDRY, D.; VILLEGAS, P. Malabsorption syndrome in broiler chickens. *Avian Diseases*, v.26, n.3, p.618–624, 1982.

PALADE, E.A.; KISARY, J.; BENYEDA, Z.; MÁNDOKI, M.; BALKA, G.; JAKAB, C.; VÉGH, B.; DEMETER, Z.; RUSVAI, M..Naturally occurring parvoviral infection in Hungarian broiler flocks. *Avian Pathol.*, v.40, p.191–197, 2011.

PANTIN-JACKWOOD, M., DAY, J.M.; JACKWOOD, M.W.; SPACKMAN, E. Enteric viruses detected by molecular methods in commercial chicken and turkey flocks in the United States between 2005 and 2006. *Avian Dis.*, v.52, p.235–244, 2008.

PANTIN-JACKWOOD, M.J.; SPACKMAN, E.; DAY, J.M.; RIVES, D. Periodic monitoring of commercial turkeys for enteric viruses indicates continuous presence of astrovirus and rotavirus on the farms. *Avian Dis.*, v.51, p.674–680, 2007.

QAMAR, M.F.; ASLAM, H.; JAHAN, N. Histopathological Studies on Stunting Syndrome in Broilers, Lahore, Pakistan. *Vet Med Int.* 2013;212830. 2013.

REBEL, J.M.; BALK, F.R.; POST, J.; VAN HEMERT, S.; ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE, N. Malabsorption syndrome in broilers. *Worlds Poult. Sci. J.*, v.62, p.17–29, 2006.

ROUSSAN, D.A.; SHAHEEN, I.A.; KHAWALDEH, G.Y.; TOTANJI, W.S.; AL-RIFAI, R.H. Simultaneous detection of astrovirus, rotavirus, reovirus and adenovirus type 1 in broiler chicken flocks. *Pol. J. Vet. Sci.*, v.15, p.337–344, 2012.

RZEŻUTKA, A.; COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food, *FEMS Microbiology Reviews*, v. 28, n. 4, p. 441–453, 2004.

SELLERS, H.S.; ZAVALA, G.; MUNDT, E. Experimental reproduction of runting and stunting syndrome in broilers. *Poult. Sci.*, E-suppl.1, p.179–180, 2009.

SOBSEY, M.D.; MESCHKE, J.S. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. p. 1-70, 2003. Available from: http://www.unc.edu/courses/2008spring/envr/421/001/WHO_VirusSurvivalReport_21Aug2003.pdf

SONGSERM, J.; POL, M. A.; VAN ROOZELAAR, D.; KOK, G. L.; WAGENAAR, F.; TER HUURNE, A. A. H.M. A Comparative Study of the Pathogenesis of Malabsorption Syndrome in Broilers. *Avian Dis.* v.;44, n. 3, p. 556-67, 2000.

STAPPENBECK, T.S.; WONG, M.H.; SAAM, J.R.; MYSOREKAR, I.U.; GORDON, J.I. Notes from some crypt watchers: regulation of renewal in the mouse intestinal epithelium. *Current Opinion in Cell Biology*, n. 10, p. 702-709. 1998.

TAKASE, K.; SHINOHARA, K.; TSUNEYOSHI, M.; YAMAMOTO, M.; YAMADA, S. Isolation and characterisation of cytopathic avian enteroviruses from broiler chicks. *Avian Pathology*, v. 18, p. 631–642, 1989.

- TARASIUK, K.; WOZNIAKOWSKI, G.; SAMOREK-SALAMONOWICZ, E. Occurrence of chicken parvovirus infection in Poland. *Open Virol J.*, v.6, p.7–11, 2012.
- TER VEEN, C.; DE BRUIJN, N. D.; DIJKMAN, R.; DE WIT, J. J. Prevalence of histopathological intestinal lesions and enteric pathogens in Dutch commercial broilers with time. *Avian Pathology*, 46, 95 -105, 2017.
- WANG, F.; FLANAGAN, J.; SU, N.; WANG, L.C.; BUL, S.; NIELSON, A.; WU, X.; VO, H.T.; MA, X.J.; LUO, Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues *J. Mol. Diagn.*, v. 14, p. 22-29, 2012.
- WOLF, S.; REETZ, J.; OTTO, P. Genetic characterization of a novel calicivirus from a chicken. *Arch. Virol.*, v.156, p.1143–1150, 2011.
- ZAVALA, G.; SELLERS, H. Runting-stunting syndrome. *Poult Informed Professional*. v.85, p.1–10, 2005.
- ZEKARIAS, B.; STOCKHOFE-ZURWIEDEN, N.; POST, J.; BALK, F.; VAN REENEN, C.; GRUYS, E.; REBEL, J.M. The pathogenesis of and susceptibility to malabsorption syndrome in broilers is associated with heterophil influx into the intestinal mucosa and epithelial apoptosis. *Avian Pathol.*, v.34, p.402–407, 2005.
- ZSAK, L.; CHA, R.M.; DAY, J.M. Chicken parvovirus-induced runting-stunting syndrome in young broilers. *Avian Dis.*, v.57, p.123–127, 2013.
- ZSAK, L.; DAY, J.M.; STROTHER, K.O. Enteric disease in broiler chickens following experimental infection with chicken parvovirus. In: Proceedings of the American Association of Avian Pathologists Annual Meeting, Seattle, WA, abstract 7598, 2009.

APÊNDICE 1

Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMG (CEUA).



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Etiologia e patologia da enterite viral em frangos de corte infectados naturalmente", protocolo do CEUA: 62/2017 sob a responsabilidade de Roselene Ecco que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 23/10/2017.

Vigência da Autorização	23/10/2017 a 22/10/2022
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	124
Peso/Idade	70g / 1(dias)
Sexo	masculino
Origem	Aviário
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	124
Peso/Idade	150g / 4(dias)
Sexo	masculino
Origem	Aviario
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	124
Peso/Idade	250g / 6(dias)
Sexo	masculino
Origem	aviario
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	124
Peso/Idade	300g / 8(dias)
Sexo	masculino
Origem	aviario
*Espécie/linhagem	Ave / híbrido
Nº de animais	124
Peso/Idade	400g / 10(dias)
Sexo	masculino
Origem	aviario

Considerações posteriores:

23/10/2017	Aprovado na reunião do dia 23/10/2017. Validade: 23/10/2017 à 22/10/2022
------------	--

Belo Horizonte, 23/10/2017.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br